Lane Medical Library

Aus dem Laboratorium der Butterexportgesellschaft Valio m. b. H.
Helsinki

ÜBER DEN ABBAU DER CELLULOSE DURCH MIKROORGANISMEN

I

ZUR MORPHOLOGIE UND PHYSIOLOGIE DER AEROBEN SPORENBILDENDEN CELLULOSE-BAKTERIEN

Akademische Abhandlung

Von

P. E. SIMOLA

Wird mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Helsinki am 22. Mai 1931 um 12 Uhr mittags im juridischen Auditorium zur öffentlichen Verteidigung vorgelegt.

HELSINKI 1931

Aus dem Laboratorium der Butterexportgesellschaft Valio m. b. H.
Helsinki

ÜBER DEN ABBAU DER CELLULOSE DURCH MIKROORGANISMEN

I

ZUR MORPHOLOGIE UND PHYSIOLOGIE DER AEROBEN SPORENBILDENDEN CELLULOSE-BAKTERIEN

Akademische Abhandlung

Von

P. E. SIMOLA

Wird mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Helsinki am 22. Mai 1931 um 12 Uhr mittags im juridischen Auditorium zur öffentlichen Verteidigung vorgelegt.

HELSINKI 1931

HELSINKI 1931
BUCHDRUCKEREI A.-G. SANA

VORWORT.

Vorliegende Arbeit ist während der Jahre 1927—1930 im Laboratorium der Butterexportgesellschaft Valio m. b. H. zu Helsinki ausgeführt worden.

Es sei mir auch an dieser Stelle gestattet dem Vorstand des Laboratoriums, meinem hochgeschätzten Lehrer, Herrn Doz. Dr. ARTTURI I. VIRTANEN, *auf dessen Anregung hin ich diese Arbeit unternommen habe, und der meine Untersuchungen mit unermüdlichem Interesse verfolgt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, meinen tiefgefühlten Dank zu bezeugen.*

Auch Herrn Doz. Dr. CARL NYBERG *bin ich für einige sehr wertvolle Ratschläge zu herzlichem Dank verpflichtet.*

Zugleich möchte ich allen meinen Freunden, die mir auf die eine oder andere Weise bei meiner Arbeit beigestanden haben, meinen besten Dank aussprechen.

Mit Dankbarkeit sei noch erwähnt, dass mir bei Ausführung dieser Arbeit eine pekuniäre Unterstützung aus dem ALFR. KORDELIN-FONDS *zur Verfügung gestanden hat.*

Helsinki, im April 1931. *Der Verfasser.*

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung ... 3

Geschichtliche Übersicht über die mikrobiologische Forschung des Celluloseabbaues ... 6

1. Ältere Untersuchungen ... 6
2. Abbau der Cellulose durch anaerobe Bakterien ... 8
3. Abbau der Cellulose durch aerobe Bakterien ... 14
4. Abbau der Cellulose durch Actinomyceten ... 22
5. Abbau der Cellulose durch Schimmelpilze ... 22

Eigene Untersuchungen ... 25

I. Kritische Prüfung der Isolierungs- und Züchtungsmethoden der cellulosezersetzenden Mikroorganismen ... 25
   1. Thermophile Bakterien ... 25
   2. Mesophile Bakterien ... 36
   3. Actinomyceten und Schimmelpilze ... 39

II. Charakteristik zweier reingezüchteter, aerober cellulosezersetzender Bakterien, Cellulobacillus myxogenes n. sp. und Cellulobacillus mucosus n. sp. ... 40
   1. Zur Methodik ... 41
   2. Morphologie und allgemeine kulturelle Eigenschaften ... 44
      A. Cellulobacillus myxogenes ... 44
      B. Cellulobacillus mucosus ... 50
   3. Einfluss einiger spezieller Faktoren auf die Bakterientätigkeit 55
      A. Einfluss der Temperatur ... 55
      B. Einfluss der Reaktion des Nährmediums ... 56
      C. Mineralsalze als Nährstoffe ... 59
      D. Einfluss einiger organischer, stickstoffhaltiger Stoffe ... 66
   4. Verhalten der Bakterien den Kohlenhydraten und den mit diesen verwandten Stoffen gegenüber ... 69
   5. Katalasegehalt der Bakterien ... 74

Zusammenfassung ... 78

Literaturverzeichnis ... 82

Erklärung der Tafeln ... 90

Tafeln

Einleitung.

Als Hauptbestandteil der Zellmembranen der höheren Pflanzen übertrifft in Bezug auf die Häufigkeit ihres Vorkommens die Cellulose weitaus alle anderen organischen Stoffe. Nach den von Schroeder (1919) angestellten Berechnungen über die Kohlenstoffbilanz der Erde entsprechen die Kohlenstoffmengen des Pflanzenreiches insgesamt etwa 1000—1100 Billionen kg Kohlendioxyd. Der überwiegende Anteil dieser gewaltigen Menge kommt der Cellulose zu.

Da Cellulose andauernd durch die Assimilationstätigkeit der Pflanzen neugebildet wird, muss sie, damit Anhäufungen nicht stattfinden, durch dissimilatorische Prozesse wieder in einfachere Verbindungen — zuletzt in Kohlendioxyd und Wasser — zurückverwandelt werden. Es ist leicht verständlich, dass dieser Abbauprozess, der hauptsächlich von Mikroorganismen bewirkt wird, zu den umfangsreichsten und bedeutungsvollsten Vorgängen in der Natur gehört.

Trotz der zahlreichen Arbeiten, zu denen die Bedeutung dieses gewaltigen Vorganges Veranlassung gegeben hat, sind jedoch unsere Kenntnisse darüber heutzutage noch in mancher Hinsicht auffallend lückenhaft. Ein flüchtiger Blick auf die Literatur genügt, um zu zeigen, dass wir von der vollständigen Lösung mancher Grundfragen noch weit entfernt sind. Man denke nur an die grossen Meinungsverschiedenheiten, die noch über eine so wichtige Frage wie das Reinzüchten der cellulosezersetzenden Mikroorganismen vorhanden sind. In seiner Cellulosemonographie drückt Hess (1928) seine Auffassung von dem Stand der bakteriologischen und biochemischen Forschung des mikrobiellen Celluloseabbaues in folgenden Worten aus: „Die Frage der Züchtung reiner zellulosespaltender Bakterien- und Pilzkulturen ist trotz der grossen, bisher

aufgewandten Arbeit noch nicht gelöst, sodass alle Versuchsergebnisse mit einer gewissen Kritik aufgenommen werden müssen. Andererseits ist die fermentative Zellulosespaltung noch zu wenig erforscht, als dass sie zu abgeschlossenen Ergebnissen über den Spaltungsmechanismus gekommen wäre." Diese Äusserung von Hess — obgleich sie ein wenig übertrieben ist — beweist klar, dass die Untersuchungen der theoretischen Seite des Gebietes der biologischen Cellulosezersetzung bis zu den letzten Zeiten wenig überzeugend gewesen sind und spiegelt gut die Ansichten wieder, die herrschend waren, als ich daran ging, meine Untersuchungen auszuführen.

Der Zweck meiner Untersuchungen war ursprünglich, die chemischen Vorgänge sämtlicher Grundtypen von cellulosezersetzenden Mikroorganismen einer eingehenden biochemischen Untersuchung zu unterziehen, wobei sowohl die Reaktionsendprodukte als die Reaktionszwischenprodukte in Rücksicht gezogen werden sollten. Im Verlauf der Arbeit war ich jedoch gezwungen, den Versuchsplan beträchtlich zu verändern. Um einwandfreie Resultate zu erhalten, erwies es sich nämlich als unbedingt notwendig, zu den Versuchen absolute Reinkulturen zu verwenden. Das Verschaffen von Reinkulturen wiederum zwang mich, eine sehr lange Zeit rein bakteriologischen Untersuchungen zu opfern, um die grossen Schwierigkeiten, mit denen das Reinzüchten in manchem Falle verknüpft ist, zu überwinden. Da mir trotz vieler Mühe das Isolieren der anaeroben, cellulosezersetzenden Mikroorganismen dennoch nicht mit Sicherheit gelang, sah ich mich andererseits gezwungen, mich in den chemischen Untersuchungen nur auf aerobe Mikroorganismen zu beschränken.

Der hier vorliegende erste Teil meiner Untersuchungen, der einen mehr bakteriologischen Charakter hat, enthält nach einer geschichtlichen Übersicht eine kurze Zusammenfassung über meine Reinzüchtungsversuche von verschiedenen cellulosezersetzenden Mikroorganismen und dann eine eingehende Charakterisierung zweier neuer cellulosezersetzender Bakterienarten.

Obgleich meine Untersuchungen hauptsächlich nur den aeroben Celluloseabbau berühren, habe ich es für angebracht gehalten, in der geschichtlichen Übersicht sämtliche wichtigeren, theoretischen Arbeiten auf diesem Gebiete zu behandeln, weil meine Untersuchungen manche Feststellungen und Erwägungen von allgemeiner Gültigkeit enthalten, umsomehr als sich in der Literatur keine ausführliche zusammenfassende Übersicht vorfindet, die sowohl ältere als neuere Arbeiten umfasst.

Geschichtliche Übersicht über die mikrobiologische Forschung des Celluloseabbaues.

1. Ältere Untersuchungen.

Die erste Beobachtung über die biologische Zersetzung der Cellulose dürfte im Jahre 1850 von dem bekannten organischen Chemiker MITSCHERLICH gemacht worden sein, der darauf aufmerksam machte, dass bei der Nassfäule der Kartoffeln die Zellmembranen zersetzt werden, sodass die Stärke sich am Boden des Gefässes absetzt. Die Wirkung sollte nach MITSCHERLICH von Vibrionen herrühren, die reichlich im Substrat enthalten waren.

Die Arbeit von TRÉCUL (1865) enthielt dann eine Beschreibung von Bakterienformen, die der Autor in Mazerationen von pflanzlichen Geweben gefunden hatte und denen gemeinsam war, dass sie durch Jod blau gefärbt wurden, weshalb sie den Namen *Amylobacter* erhielten. Diese Bakteriengruppe wurde dann später von VAN TIEGHEM (1877, 1879, 1881) etwas eingehender studiert. Die beachtenswerteste Eigenschaft des von VAN TIEGHEM beschriebenen *Amylobacter* war die Fähigkeit, die Cellulose unter Bildung von Methan, Kohlensäure und Buttersäure zu spalten. Ausser der Cellulose wurde auch die Glucose vergärt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Substrate blieb die Vergärung der Cellulose aus.

Weil aber VAN TIEGHEM in seinen Versuchen nicht reine Fasercellulose, sondern pflanzliches Gewebe, das verschiedene vergärbare Substanzen enthielt, als Gärsubstrat verwendet hat, sind seine Versuche, wie OMELIANSKI (1902) als erster hervorgehoben hat, ohne Beweiskraft. Es kommt mir wahrscheinlich vor, dass der Autor nur gewöhnliche, durch Jod sich blau färbende Buttersäurevergärer in Händen gehabt hat, die ja bekanntlich keine Wirkung auf die Cellulose haben.

Auch die gleichzeitige Angabe von Prażmowski (1879), der auf Grund blosser mikroskopischer Beobachtungen zwei Bakterienarten, *Clostridium polymyxa* und *Vibrio rugula*, eine celluloselösende Wirkung zuschrieb, und die etwas später erschienene dürftige Angabe von Gayon (1884), dass es ihm gelungen sei, einen anaeroben Bazillus in Reinzucht zu gewinnen, der aus Stroh und Papier Methan entwickelte, sind wegen der Mangelhaftigkeit der Methodik vom bakteriologischen Standpunkte aus sehr wenig beweisend.

Grösseren wissenschaftlichen Wert haben die gleichzeitigen Arbeiten von mehr chemischem Charakter, die in Hoppe-Seyler's Laboratorium in Angriff genommen wurden.

So fand Popoff (1875), dass bei der Gärung echter Fasercellulose nach Beimpfung mit Kloakenschlamm Methan, Wasserstoff und Kohlendioxyd entstanden.

Tappeiner (1881, 1882, 1883, 1884, 1888) wiederum behandelte in einer Reihe von Arbeiten die Frage, auf welche Weise die Cellulose im Darmkanal der Pflanzenfresser zersetzt wird, worüber bereits Haubner (1854) berichtet hatte. Er stellte fest, dass durch Impfen mit einer kleinen Menge vom Mageninhalt der Wiederkäuer eine kräftige Vergärung der Cellulose in geeigneten Nährmedien zu erzielen war. Als Gärungsprodukte entstanden Essigsäure und Isobuttersäure und je nach den Versuchsbedingungen bald Methan, bald Wasserstoff. Dieselben Gase traf Tappeiner auch beim Analysieren der Gase im Darmtraktus der Pflanzenfresser an, sodass eine gewisse Analogie zwischen Vergärungen in vitro und in vivo bestand.

Die erste quantitative Analyse verdanken wir Hoppe-Seyler (1886), der in seinem bekannten Versuche die Cellulosegärung in einem mit Kloakenschlamm beimpften Kolben vier Jahre lang verfolgte. Als Endprodukte der Gärung fand er Methan und Kohlendioxyd neben einer unwesentlichen Menge organischer Stoffe. Auf Grund dieser Analyse schloss Hoppe-Seyler, dass die Cellulose zuerst zu einer Hexose hydrolysiert wird, die dann nach dem Schema

$$C_6H_{12}O_6 = 3\,CO_2 + 3\,CH_4$$

in gleiche Teile von Methan und Kohlendioxyd zerfällt. Die Analyse von Hoppe-Seyler ist ohne Zweifel richtig; es ist aber klar, dass man aus solchem mit sehr bunter Kloakenflora ausgeführten, sehr träge verlaufenen Gärungsprozesse, wobei neben der eigentlichen Cellulosegärung manche sekundäre Gärungsarten möglich sind, nichts Sicheres über den Gärungsmechanismus der Cellulose folgern kann.

In mancher Hinsicht recht interessant ist eine später erschienene Arbeit von van Senus (1890). Nach van Senus ist die Zersetzung der Cellulose das Resultat symbiotischer Arbeit zweier Mikroorganismen, die einzeln auf die Cellulose ohne Wirkung waren. Die Cellulose zerfällt nach seiner Meinung in allen Fällen zuerst in Kohlendioxyd, Wasserstoff und Essigsäure. Die Bildung von Methan erfolge erst sekundär unter der reduzierenden Wirkung des Wasserstoffs auf die Essigsäure. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass bei der Einwirkung der Bakterien auf Watte die Fasern vor der Auflösung durch irgendeine von den Bakterien produzierte Schleimhülle bedeckt werden. Van Senus hat ebenfalls die ersten Versuche zur Isolierung des celluloselösenden Enzyms, der Cellulase, gemacht. Aus faulenden wässrigen Rübenmazerationen fällte er mit Alkohol eine Substanz aus, die nach seinen Angaben unter Chloroform bei 37° die Zellwände in Bohnenschnitzeln auflöste. Leider hat er nicht reine Fasercellulose als Abbausubstrat verwendet.

2. Abbau der Cellulose durch anaerobe Bakterien.

Einen sehr beträchtlichen Fortschritt brachten die Arbeiten von Omelianski 1895, 1897, 1902, 1904, 1906, 1912), der in seiner grossen Arbeitsreihe den anaeroben Gärungsvorgang sowohl vom bakteriologischen als vom chemischen Standpunkte aus eingehend behandelt hat. Es ist Omelianski, der als erster mit guter bakteriologischer Technik die anaeroben Gärungserreger zu isolieren und

zu charakterisieren versuchte und uns dabei kennen lehrte, wie ausserordentlich schwierig die Reinkultivierung dieser Mikroorganismen ist. Obgleich Omelianski bei seinen Isolierungsversuchen nicht zu sicheren Reinkulturen kam, so konnte er doch durch seine Züchtungsmethoden seine Bakterien so anreichern, dass diese wenigstens mikroskopisch einheitlich erschienen. Zugleich hat Omelianski bei der anaeroben Cellulosegärung zwei Gärungsvorgänge künstlich voneinander scheiden können, die auf die Tätigkeit zweier verschiedener Mikroorganismen zurückzuführen sind: die einen verursachten die *Methangärung,* die anderen die *Wasserstoffgärung.*

Um die Bakterien der Wasserstoffgärung anzureichern, bedient man sich ihrer grösseren Wärmebeständigkeit gegenüber den Erregern der Methangärung. Beim Anreichern wurden darum die angesetzten Kulturen, nachdem die Gärung in Gang gekommen war, 15 Min. auf 75° erhitzt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Verfahrens kann man die Methangärung schliesslich unterdrücken. Wird dagegen von einer Vorkultur beim ersten Beginn der Gasbildung in neues Nährmedium übergeimpft und dies Verfahren mehrmals wiederholt, so bleiben die Wasserstoffbakterien im Wachstum zurück, und man kommt schliesslich zu reiner Methangärung. Als Impfmaterial dienten für beide Bakterienarten gewöhnlich frischer Pferdemist oder Flussschlamm.

Die Erreger der Wasserstoffgärung sind im mikroskopischen Bilde dünne Stäbchen von 4—8 μ Länge und 0.5 μ Dicke, die endständige Sporen bilden. Die Erreger der Methangärung sind etwas zarter, aber morphologisch ungemein ähnlich. Beide Arten sind obligat anaerob. Angaben über Beweglichkeit und Gramfärbung sind nicht angeführt. Die erste Art wird in der Bakteriologie von Lehmann-Neumann als *Bacillus fossicularum,* die letztere als *Bacillus methanigenes* genannt. Die Hauptursache der Isolierungsschwierigkeiten dieser Bakterien dürfte darin bestehen, dass sie nicht auf gewöhnlichen festen Nährböden gedeihen. Überimpfungen von in vereinzelten Fällen auf Kartoffelscheiben gebildeten Kolonien auf flüssige Nährböden blieben fast durchweg erfolglos.

Als Gärungsprodukte entstanden bei der Wasserstoffgärung neben Wasserstoff und Kohlendioxyd reichlich Fettsäuren (hauptsächlich Essigsäure und Buttersäure). Bei der Methangärung entstand, neben Methan und Kohlendioxyd, hauptsächlich Essigsäure.

MacFayden und Blaxall (1899) fanden als erste, dass die Cellulose auch durch *thermophile* Bakterien sowohl anaerob als aerob bei einer Temperatur von etwa 60° zersetzt wird, und zwar mit wesentlich grösser Geschwindigkeit, als durch die mesophilen Bakterien von Omelianski. Die Zersetzung wurde immer nur mit Bakteriengemischen erzielt und war nach Meinung der Autoren wahrscheinlich symbiotischer Natur. Als Endprodukte sollten Essigsäure, Buttersäure und irgendein Furfurol-bildender Körper entstehen.

Eine etwas ausführlichere Arbeit von Kroulik (1913) zeigte, dass thermophile Bakterien in der Natur weit verbreitet sind. Die von Kroulik beschriebene, thermophile, cellulosezersetzende Bakterienart gedieh nicht auf festen Nährböden; Reinzüchtung derselben gelang ihm nicht. Als Endprodukte entstanden Wasserstoff, Kohlendioxyd, Schwefelwasserstoff, Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure; wegen der Unreinheit der verwendeten Kulturen sind aber diese qualitativen Analysenresultate von geringerer Bedeutung.

Mit Mischkulturen waren auch die chemischen Arbeiten von Pringsheim (1913) ausgeführt, der bei seinen quantitativen Bestimmungen der Endprodukte der thermophilen, anaeroben Cellulosegärung neben Kohlendioxyd und Wasserstoff nur Ameisensäure und Essigsäure fand. Das Fehlen der Buttersäure betrachtet Pringsheim als einen Unterschied zu den bei niederer Temperatur verlaufenden Cellulosegärungen.

Etwas früher hatte Pringsheim (1912) thermophile Cellulosevergärer als Versuchsobjekte mit Erfolg verwandt, als er die Zwischenprodukte bei der enzymatischen Cellulosespaltung aufzuklären versuchte. Diese wichtige Arbeit, in der er das Vorkommen der Cellobiose und Glucose als intermediäre Reaktionsprodukte bei verschiedenen Formen des Celluloseabbaues nachgewiesen hat, wird im folgenden Teil meiner Untersuchungen eingehender erörtert.

Dann trat in der Erforschung der anaeroben Cellulosezersetzung ein längerer Stillstand ein, bis nach einem Jahrzehnt die Arbeiten von Khouvine und von Langwell und Lymn eine neue Untersuchungsperiode einleiteten.

In den Arbeiten von Khouvine (1922, 1923) ist ein neuer anaerober Mikroorganismus, *Bacillus cellulosae dissolvens*, beschrieben worden, dessen Reinzüchtung dem Autor gelungen sei. Dieser im Darmkanal des Menschen vorkommende Gärungserreger ist ein streng anaerober, endständige Sporen bildender, gramnegativer Bazillus, der auf festen Nährböden nicht gedeiht. Das Isolieren desselben war mit grossen Schwierigkeiten verknüpft. Man verfuhr dabei so, dass man durch halbstündiges Erhitzen auf 70° zuerst die in flüssigen Medien angelegten Rohkulturen von sporenlosen Bakterien befreite, dann neue Subkulturen anlegte, und nach häufiger Wiederholung dieses Verfahrens schliesslich ein sogenanntes „Waschverfahren" benutzte, wobei man beim Beginn der Gärung die als Gärungssubstrat dienenden Filtrierpapierstreifen gründlich mit steriler physiologischer Kochsalzlösung wusch und mit einem Streifen wieder neue Subkulturen in frischer Nährlösung anlegte. — Als Gärungsprodukte bildet *Bacillus cellulosae dissolvens* aus der Cellulose Wasserstoff, Kohlendioxyd, Essigsäure, Buttersäure, Milchsäure, Äthylalkohol, gelbes Pigment und unbekannte Abbauprodukte. Andere Kohlehydrate vermag er nicht zu zersetzen.

Es ist wahrscheinlich, dass die mit verbesserter Methodik erzielten Kulturen von Khouvine bedeutend reiner gewesen sind als die Wasserstoffbakterienkulturen von Omelianski, aber man wird nicht vollkommen überzeugt, dass das Hauptziel der Arbeit, die Reinzüchtung, von Khouvine erreicht worden ist. Nach meinen eigenen Erfahrungen, wie ich später darlegen werde, werden auf diese Weise die Kulturen bis zu hohen Reinheitsgraden angereichert, aber zu sicheren Reinkulturen kommt man sogar nach längerem Arbeiten nicht. Es sei bemerkt, dass bei cellulosezersetzenden Bakterien die mikroskopische Homogenität kein zuverlässiges Kriterium dafür ist, dass wir wirklich eine einzige Art vor uns haben.

Der von Langwell und Lymn (1923) beschriebene Mikroorganismus war ein termophiler, fakultativ anaerober, gramnegativer Bazillus, der abweichend von den bisher beschriebenen anaeroben Bakterien gut auf gewöhnlichen, sowohl festen wie flüssigen Nährböden gedieh. Von Cellulosegärungen auf Traubenzuckeragar übergeimpft, bildet er neben sporenenthaltenden, gelben Kolonien etwas kriechende, sporenlose Kolonien, die von derselben Bakterienart stammen dürften. — Es ist aber nicht die Möglichkeit ausgeschlossen, dass die kolonienbildenden Bakterien nur Begleitbakterien der Cellulosevergärer gewesen sind. Die grossen Schwankungen bei den qualitativen wie quantitativen Analysen der Gärungsprodukte zeigen, dass die Versuche kaum mit einheitlichen Reinkulturen ausgeführt worden sind. Die äusseren Umstände können wohl nicht, wie die Autoren behaupten, solchen Einfluss haben, dass dieselbe Bakterie bald Methangärung, bald Wasserstoffgärung erzeugt.

Dem letzerwähnten Gärungserreger gleicht in vieler Hinsicht der von Viljoen, Fred und Peterson (1926) beschriebene fakultativ anaerobe, thermophile Cellulosezersetzer, später *Clostridium thermocellum* genannt, der die Cellulose unter Bildung von Kohlendioxyd, Wasserstoff, Essigsäure, Buttersäure und Äthylalkohol zu vergären imstande ist. Er bildete auf festen Nährböden Kolonien, aber merkwürdiger Weise konnten diese, wenn man sie wieder auf Cellulose überimpfte, keine Cellulosezersetzung mehr hervorrufen. Die Autoren erklärten diesen Umstand damit, dass die Bakterien durch Überimpfen auf feste, cellulosefreie Nährböden die Fähigkeit, Cellulose zu zersetzen, verlieren. Danach wäre mithin die Eigenschaft der Bakterien, Cellulose zu zersetzen, sehr leicht durch äussere Faktoren zu verändern. Obgleich ähnliche Beobachtungen über cellulosezersetzende Mikroorganismen auch von anderen Autoren angeführt sind, dürfte diese Annahme m. E. nicht zu Recht bestehen. Wie ich im experimentellen Teil beweisen werde, ist diese merkwürdige Erscheinung vielmehr auf die Anwesenheit von Cellulose nicht angreifenden Begleitbakterien zurückzuführen. Ich habe gefunden, dass,

wenn wirklich cellulosezersetzende Bakterien auf festen, cellulosefreien Nährböden Kolonien bilden können, Überimpfungen von diesen Kolonien ohne Ausnahme in cellulosehaltigen Nährmedien Zersetzung der Cellulose hervorrufen.

Die gleichzeitige, mit sehr guter bakteriologischer Technik ausgeführte Arbeit von Werner (1926) zeigt besonders gut die grossen Schwierigkeiten, mit welchen man, um echte Reinzüchtungen zu erhalten, kämpfen muss. Nach Prüfung vieler Methoden — darunter der Methode von Khouvine — mit negativem Resultat soll die Reinzüchtung des Erregers der Celluloseverdauung, der sich im Darm der Rosenkäferlarve vorfindet, dem Autor schliesslich durch sogenanntes „Ausschneideverfahren" gelungen sein. Bei diesem Verfahren schneidet man nach Bebrütung bei 37° die gewachsenen Kolonien der Begleitbakterien aus beimpften Agarplatten heraus und überführt feine Streifen von übrig gebliebenem Agar mit darin liegenden, nicht Kolonien bildenden Cellulosebakterien auf flüssige Spezialnährböden. Der so isolierte, obligat anaerobe, bei 21°—39° gedeihende, sporenbildende Cellulosevergärer, *Bacillus cellulosae fermentans*, gleicht sehr dem Wasserstoffgärer von Omelianski und Khouvine. Die Angabe des Verfassers, dass die Kulturen von *Bacillus cellulosae fermentans* auf Celluloseagar kümmerliche Kolonien bilden, die nach Übertragung auf flüssige Medien die Cellulose nicht mehr vergärten, erregt jedoch Bedenken in Bezug auf die Reinheit der Kulturen. Eine Erklärung für diese Erscheinung hat der Verfasser nicht gegeben.

Nach Beginn meiner Untersuchungen sind zwei die thermophile Cellulosegärung behandelnde Publikationen erschienen, deren Autoren im Gegensatz zu den eben erwähnten Forschern der Reinzüchtung der anaeroben Cellulosezersetzer etwas skeptisch gegenüberstehen.

Coolhaas (1928) konnte nicht mit anaeroben thermophilen Cellulosezersetzern auf Celluloseagar klare Zonen verursachende Kolonien erhalten, während ihm dies mit aeroben Bakterien gelang. In seiner kritischen Betrachtung bezweifelt er stark die Reinheit der

Kulturen von Khouvine, von Langwell und Lymn und von Viljoen, Fred und Peterson und ist der Meinung, „dass das Problem der Zellulosegärung bei hoher, sowie auch bei niedriger Temperatur noch ganz ungelöst ist".

Tetrault (1930) unterzog die Originalkultur von Viljoen, Fred und Peterson einer eingehenderen bakteriologischen Forschung und stellte fest, dass *Clostridium thermocellum* auf Celluloseagar Kolonien bildet, deren Bakterien in flüssige Spezialnährlösungen übergeimpft, die Cellulose zu zersetzen imstande waren. Es sei aber erwähnt, dass in den Subkulturen morphologisch verschiedene Bakterienformen im Gegensatz zur Originalkultur zu beobachten waren, und dass die nach der Einzellmethode gezüchteten Kulturen die Cellulose nicht zersetzen konnten. Der Autor neigt zu der Meinung, dass man mit der Symbiosetheorie die in der Arbeit vorkommenden Rätselhaftigkeiten am besten lösen könnte, lässt aber die Frage über die Einheitlichkeit der untersuchten Kultur einstweilen offen.

3. Abbau der Cellulose durch aerobe Bakterien.

Im Jahre 1904 fand van Iterson jun., dass im Grabenmoder, in der Erde und im Meerwasser Bakterien vorhanden sind, die Cellulose in rein mineralischen Nährböden bei genügendem Luftzutritt ohne sichtbare Gasbildung angreifen und sie zu einer schleimigen Masse umwandeln. Als Erreger des Abbaues sah er ein nicht Sporen bildendes, dünnes Stäbchen, *Bacillus ferrugineus*, an, welches oft in Symbiose mit einem grossen, gelben Farbstoff produzierenden, Cellulose nicht selbst angreifenden Kokkus lebte. Die Bakterien gediehen am besten bei schwach alkalischer oder neutraler Reaktion. Die Angaben beziehen sich leider auf sehr unreine Mischkulturen; vielleicht ist *Bacillus ferrugineus* nur eine Begleitbakterie gewesen.

Daneben unterschied van Iterson eine Gruppe von Bakterien, die bei Anwesenheit von Nitraten die Cellulose abbauen, wobei sie

den Sauerstoff der Nitrate verwerten und die Nitrate bis zu Stickstoff reduzieren. Obgleich solche Bakterien hierbei am besten unter Luftausschluss wirksam sind, sind sie nach dem Autor eigentlich aerobe Organismen. Später hat man diese Bakteriengruppe auf Grund dieser Arbeit in der Literatur häufig als eine charakteristische Untergruppe der cellulosezersetzenden Bakterien angeführt, was mir jedoch schlecht begründet zu sein scheint. Weil VAN ITERSON nur mit Mischkulturen arbeitete, liegt ja die Möglichkeit vor, dass die Nitratzersetzung zu Nitriten und freiem Stickstoff unter alleiniger Wirkung von Cellulose nicht angreifenden Begleitbakterien verlaufen ist. In meinen eigenen Versuchen z. B. war die Bildung von Nitriten und freiem Stickstoff beim Celluloseabbau immer auf die Begleitbakterien zurückzuführen.

Zu den aeroben Cellulosezersetzern gehören wohl auch die von MERKER (1912) beschriebenen, auf Blättern von Elodea-Arten wohnenden zwei Mikrokokkenarten, von denen *Micrococcus cytophagus* die Cellulose in eine glasige Masse verwandelt und *Micrococcus melanocyclus* beim Zersetzungsprozess dunkles Pigment produziert. Die Angaben über die Reinzüchtungsmethoden sind so dürftig, dass man daraus nichts Sicheres auf die Reinheit der Kulturen schliessen kann.

Einen grossen Fortschritt in der Isolierungstechnik der cellulosezersetzenden Mikroorganismen brachten KELLERMAN und MCBETH (1912) mit ihrer Arbeit, in der sie den sogenannten *Celluloseagar* zur Anwendung einführten. Auf diesem Nährboden, der aus feingefällter Cellulose, Nährsalzen, Calciumcarbonat und Agar bestand, bildeten die aeroben Cellulosezersetzer durchscheinende Höfe, von denen sukzessive Impfungen auf Stärkeagar und Fleischwasserpeptonagar ausgeführt wurden. Mit Hilfe dieser Methodik isolierten KELLERMAN und MCBETH aus den anaeroben Bakterienkulturen, die ihnen OMELIANSKI zugesandt hatte, drei aerobe Cellulosezersetzer: *Bacillus amylolyticus*, *Bacterium rossicum* und *Bacterium flavigenum*, die alle bezüglich ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften von OMELIANSKIS Wasserstoff- und Methanbakterien ab-

weichend waren. Die Publikation von Kellerman, McBeth, Scales und Smith (1913) enthält eine Beschreibung von 18 weiteren, neuen, cellulosezersetzenden Bakterien, die hauptsächlich aus Mooren isoliert wurden. Von allen beschriebenen Bakterienarten waren nur zwei, *Bacillus amylolyticus* und *Bacillus cytaseus*, sporenbildende. Andere sind in Bergey's Manual of Determinative Bakteriology (1923) zu einer Gattung *Cellulomonas* zusammengefasst.

Charakteristisch für diese Cellulosebakterien der amerikanischen Autoren ist, dass sie auf allen gewöhnlichen Nährböden gut gedeihen. Obgleich sie am besten unten aeroben Bedingungen arbeiten, können sie gewöhnlich mehr oder weniger auch anaerob Cellulose zersetzen. Einige Arten sollen Nitrate zu Nitriten und Ammoniak reduzieren. Ausser Cellulose können sie viele andere Kohlehydrate zersetzen. Die Zersetzung soll ohne Gasbildung verlaufen. — Es sei bemerkt, dass manche Arten auf festen, cellulosefreien Nährböden kultiviert, sehr schnell ihr Vermögen Cellulose zu zersetzen, verlieren.

Über die Befunde von Kellerman und seinen Mitarbeitern ist dann in der Literatur sehr lebhaft für und wider diskutiert worden.

Bald nach dem Erscheinen der Arbeit machte Omelianski (1912) die Einwendung, dass die klaren Zonen im Celluloseagar nur durch irgendeine, von Säuren verursachte Lösung der Kreide zustande kämen. Diese Behauptung wurde aber sofort von Löhnis und Lochhead (1913) entkräftet, indem sie zeigten, dass, wenn sie die Kreide mit Salzsäure auflösten, die klaren Zonen auf den Celluloseagarplatten nur umso schärfer hervortraten.

Pringsheim (1923) hat die Methode von Kellerman nachgeprüft und ist zu völlig negativen Resultaten gekommen. Er schreibt: „man kann zwar auf Zelluloseagarplatten zellulosezersetzende Bakterien zum Wachstum und zum Angriff auf die Zellulose bringen, aber die auf andere Nährböden übertragenen Kulturen sind nicht die Zellulosebakterien, sondern die Verunreinigungen oder Begleitbakterien, die zwar in Reinkultur gewonnen werden können, aber Zellulose nicht angreifen. Die Reinkultur zelluloselösender Bak-

terien nach der Methode von Kellerman lässt sich demnach bisher nicht durchführen." Selbst bei einer Nachprüfung der aus Amerika übersandten Kulturen kam er zu negativen Ergebnissen.

Dieselbe Meinung, dass die von Kellerman und seinen Mitarbeitern isolierten Bakterien nur Begleitbakterien gewesen wären, haben auch u.a. Hutchinson und Clayton (1919), Gray und Chalmers (1924) und schliesslich Winogradsky (1929) und Bokor (1930) geäussert.

Demgegenüber konnten Waksman und Heukelekian (1924) und Bradley und Rettger (1927) eine quantitativ messbare Zersetzung der Cellulose mit einigen Originalkulturen von Kellerman erzielen. Ebenso zeigten jüngst etwa gleichzeitig Snieszko (1929) und Skinner (1929), dass einige von Kellermans auf Fleischwasserpeptonbouillonagar über zehn Jahre gezüchteten Bakterien die Cellulose in flüssigen Medien zersetzen konnten, obgleich die Wirkung sehr abgeschwächt war.

In der schon früher zitierten Arbeit von Kroulik ist ein aerober, thermophiler Cellulosezersetzer beschrieben, der grosse, ovale Sporen bildet. Das Reinzüchten desselben gelang auf keine Weise, weil der Mikroorganismus nicht auf gewöhnlichen festen Nährböden gedieh. Als Endprodukte der aeroben Cellulosezersetzung sollten Kohlendioxyd, Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure entstehen.

Mütterlein (1913) konnte mit Hilfe von Celluloseagarplatten eine grosse Menge von cellulosezersetzenden Pilzen leicht isolieren; die Reinzüchtung der cellulosezersetzenden Bakterien bot ihm aber unüberwindliche Schwierigkeiten.

Der Befund von Hopffe (1919), dass die aus dem Pansen des Rindes isolierten Kulturen von *Bac. megatherium, Bac. Ellenbachensis, Bac. butyricus, Bac. mycoides, Bac. mesentericus vulgatus* und *B. fluorescens* eine schwache, unregelmässige Fähigkeit, Cellulose zu zersetzen, besitzen, die sie aber beim Überimpfen verlieren, dürfte auf die zufällige Anwesenheit von begleitenden, wahren Cellulosezersetzern zurückzuführen sein, die bei weiterem Züchten der genannten gewöhnlichen Bakterien ausgeschaltet wurden.

Hutchinson und Clayton (1919) beschrieben einen neuen aeroben Cellulosezersetzer, *Spirochaeta cytophaga*, der wegen seiner guten Zersetzungsfähigkeit und seines komplizierten Lebenszyklus viel Aufsehen erweckt hat. Nach der Beschreibung der Autoren sollen die spirochaetaähnlich gewundenen Formen dieses Mikroorganismus durch eine „Sporulation" in kokkenähnliche, sporoide Formen übergehen, die wieder zu Spirochaeten auskeimen können Daneben werden unter gewissen Bedingungen lange Fadenformen angetroffen, wobei die Spirochaetaformen ganz ausbleiben können. Weil es unmöglich war, diese Formen voneinander zu trennen, hielten es die Autoren für wahrscheinlich, dass diese verschiedenen Formen von einem einzigen Mikroorganismus gebildet werden. Die Isolierung des Mikroorganismus war dadurch erschwert, dass er auf festen Nährböden, selbst auf Celluloseagar nicht gedieh. Die Angabe der Autoren, dass dieser aerobe Mikroorganismus aus Cellulose u. a. Buttersäure als Zersetzungsprodukt bildet, ist meines Erachtens so zu deuten, das die Kultur nicht ganz frei von Begleitbakterien gewesen sind.

In der Arbeit von von Gescher (1922) ist über ein dünnes, an beiden Enden verjüngtes Stäbchen berichtet, das zusammen mit einem Kokkus Cellulose abbaut, und dessen Reinzüchtung ihm auf keine Weise gelang.

Auch Bojanowsky (1925) konnte ein dünnes Stäbchen nicht von einem Kokkus trennen. Er ist der Meinung, dass es sich hier anscheinend um eine Symbiose von zwei Bakterien handelt, die sich in den stufenweisen Abbau der Cellulose teilen.

Es ist möglich, dass die beiden Forscher die *Spirochaeta cytophaga* von Hutchinson und Clayton vor sich hatten.

Waksman (1926, 1927), der die cellulosezersetzenden Mikroorganismen des Bodens systematisch zu untersuchen versucht hat, schreibt der *Spirochaeta cytophaga* eine sehr grosse Bedeutung beim Celluloseabbau im Boden zu. Er konstatierte bei seinen chemischen Untersuchungen, dass die Zersetzung der Cellulose bei *Spirochaeta cytophaga* wie bei anderen von ihm untersuchten aeroben Cellulosezersetzern

von der Bildung beträchtlicher Mengen synthetischer „Zellsubstanz" begleitet war. Die Untersuchungen von Waksman werden im folgenden Teil meiner Untersuchungen etwas eingehender besprochen.

Winogradsky (1927, 1928, 1929) hat die spirochaetaähnlichen, cellulosezersetzenden Mikroorganismen einer recht umfassenden, bakteriologischen Nachprüfung unterzogen und die Befunde von Hutchinson und Clayton zum grossen Teil bestätigt. Die Bakterien von Kellerman und seinen Mitarbeitern erklärt er dagegen für Begleitbakterien der eigentlichen aeroben Cellulosezersetzer, die er in seiner letzten Publikation in drei Genera einteilt: 1. *Cytophaga.* 2. *Cellvibrio.* 3. *Cellfalcicula.* Die Cytophagen und Vibrionen bilden in alten Kulturen kokkoide Formen und Arthrosporen. Aerobe echte sporenbildende Cellulosezersetzer hatte er nicht gefunden. Alle Gruppen von Mikroorganismen sollen die zersetzte Cellulose in alkalilösliche „Oxycellulose" verwandeln. Bildung von Säuren wurde nicht festgestellt.

Auf Grund seiner ausführlichen morphologischen Untersuchungen behauptet jüngst Bokor (1930), dass die *Spirochaeta cytophaga* von Hutchinson und Clayton gar keine Spirochaeta ist, sondern in die Familie *Actinomycetaceae* unter eine neue Gattung *Mycococcus* einzureihen sei. Die Familie *Actinomycetaceae* teilt Bokor auf folgende Weise ein:

1. Gattung: *Mycococcus.* Bildung der Sporen innerhalb des ganzen Mycels, das vorher in Teilstücke zerfällt.

2. Gattung: *Actinomyces.* Bildung der Sporen auf gewisse Teile des Mycels (Hyphenenden) beschränkt.

Der beschriebene *Mycococcus cytophagus n. sp. 1929* genannte Organismus dürfte eine Übergangsform zwischen den Proactinomyceten genannten Corynebakterien und Mycobakterien einerseits und den echten Actinomyceten andererseits bilden.

Der Organismus wächst in langen, sehr dünnen, senkrecht verzweigten Fäden, die durch Plasmakontraktion in dünne, an beiden Enden zugespitzte spirochaetaähnliche Stäbchen zerfallen. In einem weiteren Entwicklungstadium findet in den Stäbchen eine Plasma-

differenzierung statt, wonach das Plasma in kokkenartige Gebilde zerfällt, die zuerst von einer äusseren Hülle umschlossen und kettenförmig zusammengehalten sind, aber dann sich loslösen, um bei passenden Bedingungen wieder zu Fäden auszuwachsen.

Der Organismus ist streng aerob, wächst nicht auf gewöhnlichen Standardnährböden und verwertet als Kohlenstoffquelle ausschliesslich Cellulose. Zur Isolierung wurden mit feinverteilter Cellulose versetzte Kieselsäuregallerte- und Gipsnährböden verwendet.

Ausser *Mycococcus cytophagus* hat Bokor in derselben Arbeit noch ein cellulosezersetzendes, dickes, gramnegatives Kurzstäbchen beschrieben, dessen Zersetzungsvermögen aber sehr bescheiden war.

Gleichzeitig mit den Untersuchungen über *Spirochaeta cytophaga*-ähnlichen Mikroorganismen erschienen viele Arbeiten, die von positiven Resultaten über die Isolierung der eigentlichen aeroben Cellulosebakterien berichteten.

Ob die von Groenewege (1920) beschriebenen, auf gewöhnlichem Nähragar gedeihenden drei Mikroorganismen: *Bacterium cella-resolvens alpha, beta und gamma* wirklich Reinkulturen von aeroben Cellulosebakterien gewesen sind, ist für mich schwer zu beurteilen, weil mir die Originalarbeit nicht zur Verfügung stand. Pringsheim (1923) hat die von Groenewege beschriebene Isolierungsmethode nachgeprüft und ist dabei zu einem negativen Resultat gekommen. Nach Beobachtungen von Groenewege soll der Denitrifikationsprozess beim Abbau der Cellulose durch symbiotische Tätigkeit zweier Gruppen von Mikroorganismen zustande kommen, von denen die eine Gruppe nur Cellulose zersetzt, die andere Abbauprodukte der ersteren benutzt und Nitrate reduziert.

Sack (1924) hat mit Hilfe des üblichen Nähragars drei Stäbchen: *Cellulomonas aurantius, flavus* und *albus* und einen Kokkus: *Cellulococcus albus* reingezüchtet, denen er die Fähigkeit, Cellulose zu zersetzen, zuschrieb. Leider hat er in der Arbeit nicht angeführt, ob diese auf Agar gut gedeihenden Mikroorganismen, in flüssige Medien überführt, Cellulose zu zersetzen imstande sind.

Der Befund von Gray und Chalmers (1924), dass der von ihnen reingezüchtete Mikroorganismus *Microspira agar-liquefaciens*, der Agar angreift, auch Cellulose zu zersetzen vermag, ist jüngst von Skinner (1929) nachgeprüft und bestätigt worden.

Bradley und Rettger (1927) haben mit Hilfe eines etwas modifizierten Celluloseagars aerobe, gramnegative Bakterien isoliert, die den Bakterien von Kellerman und seinen Mitarbeitern sehr glichen und nach der amerikanischen Nomenklatur dem Genus *Cellulomonas* eingereiht wurden. Auf gewöhnlichen Nährböden gediehen diese Bakterien relativ gut. Ausser Cellulose wurden auch viele andere Kohlenhydrate zersetzt. Die Zersetzung der Cellulose war recht langsam. Alle Arten reduzierten Nitrate zu Nitriten. Es ist möglich, dass die Bakterien von Bradley und Rettger echte Reinzüchtungen von Cellulosezersetzern gewesen sind, aber vollkommen kann man davon nicht überzeugt sein.

Rubentschik (1928) hat neben einer cellulosezersetzenden Actinomycesart zwei sporenlose, grampositive, cellulosezersetzende Bakterien kurz beschrieben, die er aus Limanschlamm mit Hilfe des Celluloseagars reingezüchtet haben soll. Die Bakterien vertrugen in Nährmedien Natriumchlorid bis 15 %.

Mit Hilfe der Celluloseagarmethode soll es auch Coolhaas (1928), der wie erwähnt, anaerobe thermophile Cellulosezersetzer nicht reinzüchten konnte, gelungen sein, einen aeroben, grampositiven, sporenbildenden, thermophilen Cellulosezersetzer, *Bacillus thermocellulolyticus*, als Reinkultur zu isolieren. Dieser Mikroorganismus zersetzt nach Coolhaas Cellulose ohne Gasbildung und bildet ausser auf Celluloseagar auch auf Zuckerbouillonagar Kolonien. Leider ist in der Arbeit nicht angeführt worden, ob die auf Zuckerbouillonagar gebildeten Kolonien solche Bakterien enthalten, die, in flüssige Medien überführt, wirklich Cellulosezersetzung hervorrufen können.

Dubos (1928) dagegen hält die Celluloseagarmethode für umständlich und für die Züchtung der streng aeroben Cellulosezersetzer sogar für unverwendbar. Beim Reinzüchten verfuhr er ganz einfach so, dass er von Anreicherungskulturen sukzessive Verdünnungen

in flüssigen Nährmedien ausführte. Die letzten Röhrchen, in denen noch Bakterienwachstum stattfand, sollten Reinkulturen von Cellulosezersetzern enthalten. Nach Dubos sind die von ihm untersuchten aeroben Cellulosebakterien in drei Gruppen einzureihen: *a*) streng aerobe, die nur Cellulose verwerten können, *b*) streng aerobe, die auf Stärkeagar, aber nicht auf gewöhnlichem Agar wachsen und *c*) fakultativ aerobe, die auf allen Nährmedien wachsen.

Bezüglich meiner Untersuchungen habe ich im Jahre 1927 auf einer Sitzung der *Gesellschaft Finnischer Chemiker* einen Vortrag gehalten, wobei ich u. a. über die Isolierung und die Eigenschaften von zwei neuen, mesophilen, aeroben Cellulosezersetzern und von einem thermophilen, aeroben Cellulosersetzer berichtete. Später ist über meine bakteriologisch-chemischen Arbeiten mit den genannten mesophilen Bakterien eine vorläufige Mitteilung (1930) erschienen.

4. Abbau der Cellulose durch Actinomyceten.

Wie ich im vorigen Kapitel erwähnt habe, soll der in der Natur weitverbreitete Mikroorganismus *Spirochaeta cytophaga* nach Untersuchungen von Bokor eigentlich zu der Familie *Actinomycetaceae* gehören und einen Übergang zwischen Bakterien und echten Actinomyceten bilden. Auf die Fähigkeit der echten Actinomyceten, Cellulose zu zersetzen, machten etwa gleichzeitig Fousek (1912), Krainsky (1913), Mütterlein (1913) und dann Scales (1915) aufmerksam. Von Krainskys aus Gartenerde reingezüchteten Actinomycesarten waren die kleinen, roten Arten am wirksamsten. Die Zersetzungsprodukte wurden von keinem der Autoren untersucht. – Nach Waksman und Dubos (1927, 1928) gedeihen die cellulosezersetzenden Actinomyceten am besten bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion und treten besonders auf trockenen Böden vor anderen cellulosezersetzenden Mikroorganismen in den Vordergrund.

5. Abbau der Cellulose durch Schimmelpilze.

Auf die „zellwandlösende“ Wirkung gewisser Schimmelpilze haben schon frühzeitig zahlreiche Botaniker aufmerksam gemacht

[vgl. z. B. Miyoshi (1885), de Bary (1886), Ward (1888), Kissling (1889), Kean (1890), Behrens (1893), Wehmer (1896), Newcombe (1899), Went (1901)]. Der Beweis, dass die Schimmelpilze wirklich *echte* Fasercellulose abbauen können, dürfte aber erst durch die früher erwähnte Arbeit von van Iterson erbracht worden sein, in welcher der Autor verschiedene Formen des aeroben Celluloseabbaues beschrieben hat. Die Arbeit zeigt zugleich, dass solche Pilze in der Natur sehr weitverbreitet sind. Es gelang dem Autor leicht, mit relativ einfacher Methodik nicht weniger als 15 Reinkulturen von Filtrierpapier-angreifenden Schimmelpilzen zu isolieren. Die Zersetzung der Cellulose ging bei diesen Kulturen allerdings relativ langsam vor sich. Bemerkenswert ist, dass bei der Zersetzung des Papiers bisweilen tiefschwarze Pigmente entstehen können, die nach Angabe des Autors den Humusstoffen nahestehen sollen.

Später haben Carbone (1911), McBeth und Scales (1913), Mütterlein (1913), Scales (1915) und Otto (1916) eine grosse Anzahl von cellulosezersetzenden Schimmelpilzarten beschrieben. Zu diesen gehören so bekannte, weitverbreitete Gattungen wie *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* usw. Es sei erwähnt, das von den von Scales geprüften 30 *Penicillium*- und 10 *Aspergillus*-Stämmen nur 7 Penicillien und 1 Aspergillus nicht imstande waren, Cellulose anzugreifen.

Nach Ellenberger (1915) und Hopffe (1919) soll ein von Hopffe isolierter, fakultativ aerober Schimmelpilz, *Aspergillus cellulosae*, der mit *Aspergillus niger* nahe verwandt ist, bei der Celluloseverdauung des Rindes eine grosse Rolle spielen.

Wie bekannt, entwickeln sich die Schimmelpilze im allgemeinen am besten bei saurer Reaktion. Nach Waksman und Dubos sollen die Schimmelpilze unter den Cellulosezersetzern die einzigen sein, welche Cellulose unterhalb des Wertes pH 6.0 zu zersetzen vermögen.

Über die Abbauprodukte der Cellulose durch die Tätigkeit der Schimmelpilze ist kaum etwas bekannt. Viele Arten dürften den grössten Teil der zersetzten Cellulose zu Kohlendioxyd und Wasser ver-

brennen. Ein beträchtlicher Teil des Kohlenstoffes der Cellulose dürfte aber dabei durch die Pilze assimiliert und zum Aufbau von Protoplasma verwendet werden, wie Heukelekian und Waksman (1925) bei einigen Schimmelpilzarten bewiesen haben.

Eigene Untersuchungen.

I. Kritische Prüfung der Isolierungs- und Züchtungsmethoden der cellulosezersetzenden Mikroorganismen.

1. Thermophile Bakterien.

Wegen ihres sehr kräftigen Vermögens, Cellulose zu zersetzen, schienen die thermophilen Mikroorganismen für meine chemischen Arbeitspläne sehr geeignet zu sein, und deshalb strebte ich beim Beginn meiner Arbeiten zuerst danach, die Vertreter dieser Gruppe als absolute Reinkulturen zu isolieren. Weil diese ersten, zeitraubenden, bakteriologischen Versuche, bei denen mehrere Methoden nachgeprüft wurden, m. E. diejenigen Umstände, welche das Arbeiten mit Cellulosezersetzern erschweren, besonders gut darlegen, habe ich in diesem Kapitel zunächst die Isolierung der thermophilen Bakterien und zwar in Bezug auf andere Gruppen relativ ausführlich beschrieben.

Wenn man sich Kulturen von celluloseangreifenden Mikroorganismen verschaffen will, bedient man sich gewöhnlich des von Omelianski ausgearbeiteten Anreicherungsverfahrens. Man verfährt dabei so, dass man eine Nährlösung, die nur geeignete anorganische Nährsalze und Cellulose in Form von Filtrierpapier enthält, mit Schlamm, Erde, Kot u. dgl. beimpft und dann nach Auftreten von Zersetzungserscheinungen ein wenig zersetztes Papier in eine frische Filtrierpapier-Nährlösung überimpft, wachsen lässt, wiederum in frische Nährlösung überimpft und so weiter fortsetzt. Auf diese Weise kann man das Wachstum der nicht celluloseangreifenden Mikroorganismen weitgehend unterdrücken und schliesslich Kulturen von Cellulosezersetzern in gewissem Reinheitsgrade

erzielen; nach einigen Autoren soll man auf diesem Wege sogar Reinkulturen erhalten.

Beim Weiterarbeiten mit den so erzielten Rohkulturen benutzt man gewöhnlich als Grundnährmedium dieselbe Nährsalzkombination wie bei der Anreicherung.

Die Zusammensetzung der Nährlösung von Omelianski war folgende:

$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
K_2HPO_4	1.0 „
$MgSO_4$	0.5 „
NaCl eine Spur	
Destilliertes Wasser	1000 ccm

Noch einfacher zusammengesetzt waren die von van Iterson angewandten Nährlösungen, die als Nährsalze nur 0.05 % primäres oder sekundäres Kaliumphosphat und 0.05—0.25 % Ammoniumchlorid, Ammoniumnitrat oder Kaliumnitrat enthielten.

Die meisten übrigen von den zahlreichen, für Cellulosezersetzer vorgeschlagenen Nährmedien haben in Bezug auf Zusammenstellung und Konzentration der Nährsalze ihren Ursprung in dem Originalnährmedium von Omelianski. Im Folgenden habe ich einige Beispiele angeführt.

Nährlösung von Kellerman und McBeth:

$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
K_2HPO_4	0.5 „
$MgSO_4$	0.5 „
NaCl	0.5 „
Wasser	1000 ccm

Nährlösung von Bradley und Rettger:

KNO_3	2 g
K_2HPO_4	1 „
$MgSO_4$	1 „
NaCl	1 „
Wasser	1000 ccm.

Nährlösung von Dubos:

$NaNO_3$	0.5 g
K_2HPO_4	1.0 „
$MgSO_4$	0.5 „
KCl	0.5 „
$FeSO_4$	0.01 „
Wasser	1000 ccm

Etwas mehr von der Omelianski-Lösung abweichend sind folgende Nährmedien:

Nährlösung von Löhnis und Lochhead:

K_2HPO_4	0.2 g
Thomasmehl	2.0 „
$MgSO_4$	0.1 „
NaCl	0.01 „
Wasser	1000 ccm

Als Stickstoffquelle am besten 0.1 % Fleischextrakt.

Nährlösung von Viljoen, Fred und Peterson:

$Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$	2.0 g
KH_2PO_4	1.0 „
$CaCl_2$	0.3 „
Pepton	5.0 „
Wasser	1000 ccm

Ob irgendein von den in der Literatur angeführten Nährmedien den Cellulosezersetzern bessere Lebensmöglichkeiten bietet als dasjenige von Omelianski ist a priori schwer zu beurteilen, weil die Autoren ihre Modifikationen gewöhnlich in keiner Weise motiviert haben.

Bei den ersten Versuchen mit thermophilen Bakterien bediente ich mich der Nährlösung von Omelianski. Als Impfmaterial dienten Proben von Ackerböden, Misthaufen, Schlamm, Pferde- und Menschenkot. Von diesen Proben wurden kleine Mengen, die von einer Platinöse voll bis etwa 2 g variierten, in eine grosse Reihe von Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt überführt, die mit

Filtrierpapierstreifen und 40 ccm Omelianski-Lösung beschickt waren. Nach 48-stündiger Bebrütung bei 60° war in allen denjenigen Kolben, die mit etwa 0.5—2 g Mist beimpft worden waren, ein deutlicher Zerfall der Cellulose zu beobachten und desgleichen in einem Teile der Kolben, in welche reichlich anderes Impfmaterial eingeführt worden war. In denjenigen Kolben, die mit einer sehr kleinen Menge von Impfmaterial beimpft worden waren, trat ein Zerfall nur hier und da ein und zwar erst nach 5—6 Tagen. Mit Menschenkot wurde die thermophile Zersetzung nicht erzielt.

Von denjenigen Kolben, bei denen der Zerfall am kräftigsten war, wurde 3—4 Tage nach der Beimpfung die trübgewordene Kulturflüssigkeit zum grössten Teil abgegossen, an deren Stelle neue sterile Nährlösung zugesetzt und zugleich ein Teil des mit Bakterien besetzten Filtrierpapiers durch neue Filtrierpapierstreifen ersetzt. Nach 3—4 Tagen wurde die Flüssigkeit und ein Teil des Papiers wieder erneuert. Auf diese Weise setzte man drei Wochen lang fort.

Alle nach diesem Verfahren erzielten Kulturen waren obligat aerob. Zwar waren hier und da in den ersten Anreicherungsstadien Mikroorganismen zu beobachten, die unter streng anaeroben Bedingungen Filtrierpapier unter Gasbildung kräftig angriffen, beim Fortsetzen des Anreicherns verschwanden jedoch die Anaerobier total, obgleich das am Boden des Kolbens liegende Papier sicher auch Lebensmöglichkeiten für Anaerobier darbot.

Allen erzielten Rohkulturen gemeinsam war, dass man, um neue Subkulturen zu erreichen, sehr beträchtliche Mengen zersetzten Papiers oder getrübter Kulturflüssigkeit als Impfmaterial verwenden musste. Weil dieser Umstand m. E. dahin deutete, dass eine nur Mineralsalze enthaltende Kulturflüssigkeit für diese Mikroorganismen nicht besonders geeignet war, so versuchte ich durch Hinzufügen gewisser organischer Stoffe die Tätigkeit der Organismen anzuregen. In der Tat gelang es mir nach kurzem Experimentieren, ganz einfach durch Zusatz von 0.05—0.1 % Pepton oder Liebigs Fleischextrakt in die Omelianski-Lösung, die Zersetzung der Cellulose wesentlich zu fördern, sodass ich durch Überimpfen mit einer Pla-

tinöse von Stammkulturen in die etwas modifizierte Nährlösung in einigen Fällen schon nach 24 Stunden den Zerfall der Cellulose erzielen konnte. Grössere Konzentrationen von Pepton oder Liebigs Fleischextrakt schienen unnötig zu sein.

Für die weiteren Isolierungsversuche wurden von den zwölf Stammkulturen die drei kräftigsten ausgewählt, die alle aus Mist herstammten. Von diesen drei Kulturen wurden mittels Platinöse in Proberöhrchen, die mit 10 ccm modifizierter Nährlösung und zwei Filtrierpapierstreifen (6 × 1 cm) beschickt waren, Überimpfungen vorgenommen. Sobald die Streifen zu zerfallen begonnen hatten, wurde etwas zerfallenes Papier in ein neues Proberöhrchen übergeführt und in dieser Weise zwei Wochen lang fortgesetzt. In den erhaltenen Kulturen herrschten einander sehr ähnliche sporenbildende Stäbchen vor, unter denen sich auch Trommelschlägerformen befanden. Sichtbare Gasbildung war nicht zu beobachten. Der Zerfall des Filtrierpapiers war recht charakteristisch: die Papierstreifen konnten an der Wand des Proberöhrchens ziemlich lange nach Beginn des Zersetzungsprozesses wie unberührt liegen bleiben, zersetzten sich aber schon bei ganz leichtem Schütteln des Rohres in zahllose Fasern. Bei längerem Fortschreiten des Abbaues sank der unzersetzt gebliebene Rest des Papiers von selbst als schwach graugelb gefärbte, breiige Masse auf den Boden des Rohres. In anaeroben mit Pyrogallol und Natriumhydroxyd verschlossenen Röhrchen fand auch nach längerer Bebrütung keine Zersetzung statt.

Die Bakterien dieser Stammkulturen waren so homogen und einander so ähnlich, dass man auf Grund der mikroskopischen Untersuchung allein diese Anreicherungen als Reinkulturen desselben Mikroorganismus hätte betrachten können. Doch zeigten einige orientierende Versuche, dass es sich nicht so einfach verhielt.

Beim Anlegen von Plattenkulturen machte ich die Beobachtung, dass die in den genannten drei Stammkulturen vorkommenden Bakterien nach 48-stündiger Bebrütung bei 60° auf gewöhnlichem, zuckerfreien Nähragar reichlich Kolonien bildeten; und zwar traten auf fast allen Plattenserien dieselben zwei Kolonienformen

hervor, die sporenbildende Bakterien enthielten. Von diesen war die eine unregelmässig, flach, längs der Oberfläche kriechend, die andere von gewöhnlicher, runder, erhabener Form. Es war aber merkwürdig, dass Impfungen von diesen Kolonien in Kulturröhrchen keine Zersetzung des Filtrierpapiers hervorriefen, obgleich die kolonienbildenden Bakterien mikroskopisch den Cellulosezersetzern der Originalkulturen in hohem Masse glichen. Ich machte Impfungen von nahezu hundert Kolonien, erzielte aber einen Cellulosezerfall im flüssigen Medium nur hin und wieder, wenn ich eine ganze Kolonie überführte.

Hier trat mir also die Erscheinung entgegen, die ich in der geschichtlichen Übersicht besprochen habe, und die man so gedeutet hat, dass die Cellulosebakterien, sobald sie auf festen, cellulosefreien Nährböden gewachsen sind, ihr Vermögen, Cellulose zu zersetzen, verlieren. Mir erschien diese Erklärungsweise minder glaubhaft, und ich stellte statt dessen die Arbeitshypothese auf, dass die von mir angereicherten thermophilen Cellulosezersetzer gar nicht auf gewöhnlichem Nähragar wachsen, sondern dass die auf den Platten gut entwickelten Kolonien von Begleitbakterien herstammen, die nach ihrem mikroskopischen Aussehen den eigentlichen Cellulosezersetzern sehr ähneln, aber Cellulose nicht angreifen können. Infolgedessen musste ich, um wirkliche Reinkulturen zu erzielen, durch irgendeine geeignete Massnahme die auf gewöhnlichen Nährböden wachsenden Bakterien von meinen Kulturen auszuschalten versuchen.

Bevor ich daran ging, diese Reinzüchtungsversuche auszuführen, machte ich eine grosse Reihe von vergleichenden Untersuchungen, um zu beurteilen, welche der von den verschiedenen Autoren und von mir selbst kombinierten Nährmedien für das Züchten der thermophilen sowie der anderen Arten von Cellulosezersetzern am geeignetsten wären. Es ergab sich aus diesen ziemlich umfassenden, unter verschiedenen Bedingungen ausgeführten Vorversuchen, die ich der Raumersparnis wegen hier nicht eingehender wiedergebe, dass keine von den geprüften Nährsalzkombinationen besondere

Vorteile gegenüber der einfachen Kombination von Omelianski brachte. Im Gegenteil verlief der Zersetzungsprozess oft langsamer, wenn z. B. an Stelle der Ammoniumsalze Nitrate verwendet wurden. Das Hinzufügen von Eisensalzen schien unnötig zu sein, wenn man das eisenhaltige Leitungswasser von *Helsinki* bei der Nährbodenbereitung benutzte.

In meinen späteren bakteriologischen Versuchen habe ich fast ausschliesslich als Gründnährlösung für alle geprüften cellulosezersetzenden Mikroorganismen (bei Schimmelpilzen benutzt man besser statt des sekundären Kaliumphosphates das primäre) folgende Nährsalzlösung benutzt, die nur ein wenig von der Omelianski-Lösung abweicht:

$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
K_2HPO_4	1.0 „
$MgSO_4$	0.5 „
NaCl	0.5 „
Leitungswasser	1000 ccm

Gewöhnlich wurde diese Nährlösung als solche für erste Anreicherungen verwendet; bei späteren, reineren Anreicherungskulturen wurde der Nährlösung oft etwas Pepton und Liebigs Fleischextrakt zugesetzt.

In den folgenden, kurz beschriebenen Versuchen habe ich die Anwendbarkeit verschiedener, in der Literatur angeführter Reinzüchtungsmethoden nachgeprüft. Als Reinkulturen wurden nur solche Züchtungen betrachtet, die, auf gewöhnlichen Nähragar geimpft, kein Wachstum zeigten. Zur Prüfung der Cellulosezersetzung dienten „Kulturröhrchen", die wie früher geschildert bereitet waren. Die Bebrütung fand bei 60° statt.

Waschverfahren. Sobald die Filtrierpapierstreifen in den Kulturröhrchen die ersten Zeichen von Zersetzung aufwiesen, wurden sie der Kulturflüssigkeit entnommen und in sterilen Petrischalen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gründlich gewaschen, um alle Begleitbakterien zu entfernen. Dann wurden die Papierstreifen in einer physiologische Kochsalzlösung enthaltenden Flasche mit Glas-

splittern kräftig durchgeschüttelt, um die an den Cellulosefasern anhaftenden Cellulosebakterien von den Fasern loszuscheuern und in die Lösung zu bringen. Von dieser Kochsalzlösung wurden dann Impfungen in neuen, frischen Röhrchen angelegt. Das Verfahren wurde sukzessiv noch dreimal wiederholt. Das Anlegen von Kulturen auf Agar zeigte dann, dass schliesslich alle so erzielten Subkulturen reichlich kolonienbildende Bakterien enthielten. Trotz vieler Versuche gelang es mir nicht, dieselben mittels dieser Methode auszuschalten.

Verdünnungsverfahren. Weil anzunehmen war, dass in denjenigen Kulturen, wo eine kräftige Cellulosezersetzung stattfand, die Cellulosebakterien bezüglich ihrer Anzahl vorherrschend waren, so lag natürlich die Möglichkeit vor, dass in einer auf gewöhnliche Weise ausgeführten Verdünnungsserie die letzten Röhren, in denen noch Bakterienwachstum auftrat, nur Cellulosezersetzer enthielten. Die zahlreichen in dieser Richtung ausgeführten Versuche hatten aber keinen Erfolg.

Erhitzungsverfahren. Die Sporen der thermophilen Bakterien erwiesen sich als sehr thermoresistent. Sie ertrugen gut eine 10 bis 15 Minuten währende Erhitzung auf 100°. Ich glaubte daher zuerst, dass es möglich sein würde, durch geeignete Erhitzung die Begleitbakterien auszuschalten. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Sporen der Begleitbakterien noch resistenter waren, sodass auch dieser Weg nicht zum Ziele führte.

Ausschneideverfahren. Es wurden mittels eines Platindraht-Dreiecks fünf Agarplatten nacheinander mit zersetztem Papierbrei beimpft. Nach zwei Tagen wurden die auf dem Agar gewachsenen Kolonien der Begleitbakterien aus der vierten und fünften Platte mit einem sterilen Messer herausgeschnitten. Die beiden Platten wurden noch zwei Tage lang bebrütet und alsdann alle entstandenen Kolonien herausgeschnitten. Dann wurden aus dem übrigen Agar dünne Schnitten in Kulturröhrchen überführt in der Hoffnung, dass die in den Streifen eventuell noch vorhandenen unbeschädigten Cellulosezersetzer Zersetzung hervorrufen würden. Es stellte sich aber heraus, dass sich immer, wenn

man mit einem solchen Streifen einen Zerfall der Cellulose erzielte, in der Kultur gleichzeitig auf Agar wachsende Bakterien befanden. Die Ursache zum Misslingen lag wahrscheinlich entweder darin, dass im Impfmaterial die Begleitbakterien in grösserer Zahl als die Cellulosebakterien enthalten waren, oder darin, dass nicht alle Begleitbakterien binnen 4 Tagen zu Kolonien entwickelt und infolgedessen nicht ausgeschnitten worden waren.

Verwendung des Celluloseagars. Zur Herstellung des Celluloseagars benutzte ich zuerst mit Sand feingeriebene Filtrierpapierfasern und dann nach der Methode von Scales (1915) aus etwa 76 %-iger Schwefelsäure mit Wasser feingefällte Cellulose. Beim Verfahren nach Scales wurden in einen 2 Liter fassenden Kolben 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 60 ccm Wasser eingefüllt; nachdem die Temperatur der Lösung auf 60° gesunken war, wurden 5 g mit Wasser durchfeuchtetes Filtrierpapier zugesetzt, eine kurze Zeit sehr kräftig geschüttelt, bis die Cellulose sich löste, und dann mit Leitungswasser schnell auf etwa 2 Liter aufgefüllt. Dann wartete man, bis die ausgeflockte Cellulose sich absetzte, wonach dekantiert und durch ein Faltenfilter filtriert wurde. Ich pflegte die feingefällte Cellulose auf dem Filter mehrere Tage lang zuerst mit Leitungswasser, dann mit destilliertem Wasser zu waschen. Der von mir angewandte Celluloseagar enthielt gewöhnlich in der oben angeführten Grundlösung etwa 0.5 % feine Cellulose und 1—1.5 % Agar. Calciumcarbonat wurde nicht zugesetzt.

Beim Anlegen von Kulturen auf beiden Arten von Celluloseagarplatten gelang es mir in keiner Weise, auf mechanisch zerkleinerte Cellulose enthaltenden Platten Kolonien von Cellulosezersetzern zu erzielen, was vielleicht auf die ungleichmässige Verteilung der relativ groben Fasern zurückzuführen ist, während mir dies durch Anwendung von gefällter Cellulose nach vielen misslungenen Versuchen schliesslich gelang.

Die Kolonien der Cellulosebakterien sind wegen ihres runden, durchsichtigen Lösungsfeldes besonders leicht zu erkennen. Bei 3 Tage alten Kulturen war der Durchmesser der weissgrauen, runden,

sehr dünnen Kolonien etwa 2- 3 mm; die die Kolonien umschliessende, durchscheinende Enzymzone war etwa 1—2 mm breit.

Durch Überimpfen von diesen gut abgegrenzten Kolonien in Kulturröhrchen wurde nach 48 Stunden bei 60° eine kräftige Cellulosezersetzung des Filtrierpapiers hervorgerufen; das Anlegen von Plattenkulturen auf gewöhnlichem, cellulosefreien Nähragar zeigte, dass die in flüssigem Medium cellulosezersetzenden Subkulturen dennoch nicht frei von auf Nähragar gut wachsenden Bakterien waren. Auch wenn man direkt von Lösungsfeld-Kolonien auf gewöhnlichen Agar überimpfte, war darin das Wachstum von Bakterien zu beobachten, die nicht imstande waren, Cellulose anzugreifen. Es sah also so aus, als ob die Hypothese wirklich zuträfe, dass die thermophilen Cellulosebakterien, wenn sie auf cellulosefreiem Nährboden wachsen, sogleich ihr Vermögen, Cellulose zu zersetzen, verlieren.

Die eingehendere Untersuchung aber erwies, dass es sich dennoch nicht so verhielt, sondern dass meine Annahme, dass die Kolonien-bildenden Bakterien nur Begleitbakterien sind, zu recht bestand.

Ich machte nämlich die Beobachtung, dass sich auf Celluloseagarplatten neben Lösungsfeld-Kolonien immer sehr reichlich solche Kolonien entwickelten, die keine Lösung der Cellulose auf Platten verursachten und, auch in flüssige Medien übertragen, die Cellulose nicht anzugreifen vermochten. Dagegen gediehen diese Bakterien auf gewöhnlichem Agar gut. Man konnte annehmen, dass die von mir zuerst untersuchten Lösungsfeld-Kolonien vielleicht Mischkulturen von Begleitbakterien und eigentlichen Cellulosebakterien gewesen waren. Und in der Tat war dies der Fall. Durch Anlegen einer sehr grossen Menge von Plattenkulturen und durch Prüfung von zahllosen Kolonien gelang es mir, Kolonien zu entdecken, die auf gewöhnlichem Agar nicht wachsende Bakterien enthielten. Die Kulturen, die ich durch Überimpfen von diesen einheitlichen Lösungsfeld-Kolonien in Kulturröhrchen erzielte, betrachtete ich als Reinkulturen von thermophilen Cellulosezersetzern. — Die Ent-

deckung solcher Kolonien war dadurch erschwert, dass die spärlichen Reinkolonien auf Platten gewöhnlich von Mischkolonien ihrem Aussehen nach nicht zu unterscheiden waren. Es schien, als ob die auf Platten in grösserer Anzahl vorkommenden Begleitbakterien eine besondere Neigung zum Zusammenleben mit Cellulosebakterien gehabt hätten. — Im übrigen ist das Arbeiten bei 60° mit Plattenkulturen speziell wegen des schnellen Trocknens der Platten sehr mühselig.

Um die auf diese Weise reingezüchteten Kulturen weiter zu züchten, bediente ich mich der Kulturröhrchen, denen etwas Calciumcarbonat zugesetzt wurde. Die in den Kulturröhrchen gewachsenen Bakterien waren obligat aerobe, sporenbildende, gramnegative, gut mit Methylenblau zu färbende, dünne Stäbchen von 1.4—3.2 μ Länge und 0.3—0.6 μ Breite. Die Optimaltemperatur lag bei 55—60°. Über 64° wuchsen die Bakterien nicht. Bei 37° war keine Cellulosezersetzung zu beobachten. Auf den geprüften gewöhnlichen Nährmedien wie Nährbouillon, Kartoffeln und Milch wurde kein Wachstum beobachtet.

Der Abbau der Cellulose begann in Kulturröhrchen bei 55—60° im allgemeinen nach 48 Stunden und war recht energisch. In Röhrchen, die keine Kreide enthielten, sank die Reaktion der Kulturflüssigkeit binnen 3—4 Tagen nach der Beimpfung von pH 7.0–7.2 bis auf etwa pH 5.6—5.8. Es zeigte sich aber bald, dass beim Weiterzüchten die Zersetzungsfähigkeit der Bakterien rasch abzunehmen begann, sodass der Anfang der Zersetzung beim Impfen in frische Kulturröhrchen von Woche zu Woche immer später eintrat, und als die Kulturen, weil mir der Brutschrank von 60° aus besonderen Gründen nicht zur Verfügung stand, in den Kulturröhrchen etwa vier Monate lang ohne Erneuerung bei Zimmertemperatur stehen geblieben waren, waren die Bakterien so degeneriert, dass sie auf Celluloseagar vor dem Trocknen des Nährbodens keine Kolonien bildeten und in Kulturröhrchen den Cellulosezerfall erst nach 11—13 Tagen hervorbrachten. Ich musste daher leider auf die beabsichtigten chemischen Untersuchungen mit dieser Bakterie

verzichten. — Jedoch hatte ich m. E. den Weg gefunden, auf welchem man zu sicheren Reinkulturen der aeroben, thermophilen Cellulosebakterien kommen kann, und im übrigen waren die erreichten Erfahrungen mir sehr von Nutzen, als ich mit anderen celluloseabbauenden Mikroorganismen arbeitete.

2. Mesophile Bakterien.

Aerobe Bakterien. Zur Isolierung der bei 37° gedeihenden aeroben Mikroorganismen wurden eine Reihe mit gewöhnlicher Nährlösung und Filtrierpapier beschickter Erlenmeyerkolben von 50 ccm Inhalt mit verschiedenen Mengen von Ackererde, vermodertem Torf, Mist, Schlamm, Kuh-, Pferde- und Menschenkot beimpft und dann, wie früher beschrieben, zuerst durch Wechseln der Kulturflüssigkeit und dann durch wiederholte Impfungen mit kleinen Mengen des zersetzten Papiers Anreicherungskulturen von celluloseangreifenden Bakterien gemacht. Es erwies sich, dass aus allen untersuchten Impfmaterialen Anreicherungen von aeroben Cellulosebakterien zu erhalten waren, aus Kot verschiedenen Ursprungs allerdings unregelmässig. Viele der Anreicherungen griffen Cellulose in rein mineralischer Nährlösung an. Einige bedurften eines Zusatzes von etwas Pepton und Liebigs Fleischextrakt, bevor sie zur Cellulosezersetzung fähig waren.

Von den erhaltenen etwa 15 Anreicherungen wurden 6 der energischsten Kulturen, die aus Ackererde, vermodertem Torf und Mist herstammten, zu den eigentlichen Isolierungsversuchen angewandt. Dabei machte ich mit gutem Erfolge Gebrauch von dem Celluloseagar. Die Resultate mit anderen Reinzüchtungsmethoden waren hier wie bei den thermophilen Bakterien weniger zufriedenstellend.

Beim Anlegen von Plattenkulturen auf Celluloseagar, wozu mit Bakterien besetztes Filtrierpapier als Impfmaterial diente, wurde bei allen sechs Anreicherungskulturen die Bildung von Lösungsfeld-Kolonien nach 28—48 Stunden beobachtet. Die direkt von Anreicherungskulturen auf Celluloseagar erhaltenen Lösungsfeld-

Kolonien waren aber in der Regel Mischkolonien, die neben Cellulosebakterien verschiedenartige, auf gewöhnlichem Agar gut wachsende, aber Cellulose nicht angreifende Begleitbakterien enthielten. Durch Anlegen neuer Subkulturen von Lösungsfeld-Kolonien auf Celluloseagar war es jedoch im Vergleich zu den thermophilen Bakterien leicht, einheitliche Kolonien zu trennen, die, in Kulturröhrchen übergeimpft, eine kräftige Cellulosezersetzung hervorriefen.

Als Kriterium auf die Reinheit diente die Tatsache, dass nach Überimpfung von Kulturröhrchen auf Nähragar und Nährgelatine auf diesen Nährmedien binnen zwei Wochen keinerlei Kolonien von Cellulose nicht angreifenden Bakterien wuchsen. Zwar wurde festgestellt, dass sich aus einem Teil der Kulturen auf Nähragar binnen 3—4 Tagen sehr kleine, runde, bläuliche Kolonien entwickelten, aber es erwies sich, dass diese Kolonien von eigentlichen Cellulosezersetzern gebildet waren.

Die eingehendere Untersuchung zeigte nämlich, dass in den geprüften sechs Anreicherungen, die, wie gesagt, den anderen Anreicherungen gegenüber die kräftigsten waren, zwei Arten von Cellulosebakterien vorkamen: die eine Art, die in denjenigen zwei Anreicherungen, die deutlich die stärkste Cellulosezersetzung zeigten, vorherrschte, gedieh auf Nähragar äusserst schlecht und bildete darin keine sichtbaren Kolonien, die andere Art, die der Zersetzungserreger in den übrigen vier Anreicherungen war, konnte dagegen auf Nähragar kleine, gut ausgebildete Kolonien bilden, deren Überimpfung in Kulturröhrchen die Zersetzung des Papiers bewirkte. Das Zersetzungsvermögen der Bakterien war bei Reinkulturen etwa gleich gross wie bei unreinen Anreicherungskulturen.

Die Reinheit der Kulturen wird etwas später, wenn ich die Eigenschaften dieser Bakterien ausführlich beschreibe, nochmals besprochen.

Was die anderen Anreicherungskulturen anbelangt, so wurden in manchen Fällen durch Überimpfen auf Celluloseagar Lösungs-

feld-Kolonien erzielt, in denen etwas andersartige Bakterienformen vorkamen. Weil aber die Zersetzung der Cellulose durch diese sehr langsam zu verlaufen schien, wurde die nähere Untersuchung dieser Mikroorganismen aufgegeben. Dagegen habe ich die zwei obigen Bakterien, die eine bedeutende Rolle in dem aeroben Celluloseabbau zu spielen scheinen, eingehend untersucht.

Anaerobe Bakterien. Die Anreicherung der Anaerobier geschah in mit Pyrogallol und Natriumhydroxyd verschlossenen Kulturröhrchen. Es war ziemlich leicht, bei Anwendung von Kuh-, Pferde-, Kaninchen- und Menschenkot relativ kräftige Anreicherungen zu erzielen, aber absolute Reinkulturen daraus zu isolieren, war mir trotz vieler langwieriger Versuche unmöglich.

Durch längeres einfaches Anreichern auf die früher beschriebene Weise konnte man zwar oft mikroskopisch homogene Kulturen erzielen; wenn man aber davon Überimpfungen auf feste Nährböden machte, so entwickelten sich darauf unter anaeroben Bedingungen immer solche Kolonien, die, in Kulturröhrchen überführt, keinen Zerfall der Cellulose hervorbrachten und deshalb augenscheinlich von Begleitbakterien gebildet waren. Die Versuche, auf Celluloseagar einheitliche Kolonien von cellulosezersetzenden Bakterien zu entdecken, waren erfolglos. Man konnte z. B. durch Überimpfen von Gasblasen, die sich bei einigen Kulturen in Celluloseagar-Säulen unter anaeroben Bedingungen bildeten, fast regelmässig in Kulturröhrchen cellulosezersetzende Kulturen erzielen; aber diese waren immer mit Begleitbakterien verunreinigt. Auch andere bei thermophilen Bakterien beschriebene Isolierungsverfahren, wie das „Waschverfahren“ und das „Ausschneideverfahren“, führten nicht zu solchen Resultaten, dass ich die erzielten Kulturen als wirkliche Reinkulturen hätte bezeichnen können.

In sämtlichen Anreicherungskulturen schienen hauptsächlich grammnegative Stäbchenbakterien vorzukommen. Die weitere Untersuchung der Anreicherungen wurde als nutzlos aufgegeben.

3. Actinomyceten und Schimmelpilze.

Die Reinzüchtung der celluloseangreifenden Aktinomyceten und Schimmelpilze ist sehr leicht. Ich verfuhr dabei so, dass ich gewöhnliche Kulturröhrchen mit Ackererde oder Torf beimpfte und von den ersten aeroben, noch sehr unreinen Anreicherungen Plattenkulturen auf Celluloseagar und von den darauf entwickelten, leicht erkennbaren Kolonien der Aktinomyceten und Schimmelpilze weiterhin auf Celluloseagar Streukulturen anlegte. Man kann auch Kulturen von Schimmelpilzen ganz einfach dadurch erzielen, dass man Celluloseagarplatten einige Zeit an verschiedenen Orten offen liegen lässt und die nach Luftbeimpfung auf Celluloseagar entwickelten Kolonien von Schimmelpilzen direkt in Kulturröhrchen überimpft. Es ist vorteilhaft, aber keineswegs unbedingt notwendig, bei Schimmelpilzen statt des sekundären Phosphates das primäre anzuwenden.

Von den Aktinomycesarten war eine rotes Pigment produzierende Art in der Ackererde und im Torf sehr häufig und zersetzte Cellulose gegenüber anderen Arten am kräftigsten. Das rote Pigment der Kolonien hatte unter gewissen Bedingungen die Neigung schwarz zu werden, sodass dunkle Körper entstanden.

Die isolierten Schimmelpilzen gehörten zu den Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Botrytis* und *Cladosporium*. Die Cellulose wurde bei dem Abbauprozesse oft dunkelgefärbt.

Die Zersetzung der Cellulose verlief bei allen isolierten Aktinomyceten und Schimmelpilzen viel langsamer als bei den isolierten zwei aeroben Bakterien.

Wenn ich meine Erfahrungen bei der Isolierung von verschiedenen Typen von cellulosezersetzenden Mikroorganismen zusammenfasse, so scheint mir aus meinen Versuchen hervorgegangen zu sein, dass die Erzielung von absoluten Reinkulturen der Cellulosebakterien mit Sicherheit nur dann gelingt, wenn es möglich ist, nach dem gebräuchlichen Isolierungsprinzip unter Anwendung von festen Nährböden die Bakterien von Kolonien aus reinzuzüchten. Sehr

gut bewährte sich als fester Nährboden für Cellulosebakterien der Celluloseagar, zu dessen Bereitung aus Schwefelsäure fein ausgefällte Cellulose angewandt wurde.

Ich möchte besonders hervorheben, dass die auf Celluloseagar gebildeten Kolonien oft Mischkolonien sind, und dass m. E. alle auf festen Nährböden von anscheinend reinen Kulturen der Cellulosebakterien gebildeten Kolonien, deren Bakterien keine Cellulosezersetzung hervorrufen, auf Begleitbakterien zurückzuführen sind. Die Behauptung, dass cellulosezersetzende Bakterien sofort, wenn sie auf cellulosefreiem Medium wachsen, ihre Fähigkeit, Cellulose zu zersetzen, verlieren, halte ich für unrichtig.

Das Reinzüchten der anaeroben Cellulosebakterien gelang mir auf keine Weise. Dieser Umstand ist aber keineswegs so zu deuten, dass es sich dabei um irgendeine symbiotische Tätigkeit zweier Mikroorganismen handelt, sondern ich halte es für durchaus wahrscheinlich, dass die Isolierung der anaeroben Cellulosebakterien als einheitliche Kulturen durch längeres, gründliches Experimentieren mit Hilfe des Celluloseagars schliesslich erfolgreich sein kann. Sollte sich die Celluloseagarmethode dabei nicht bewähren, so könnte danach das Ausschneideverfahren die beste Aussicht für das Gelingen bieten.

II. Charakteristik zweier reingezüchteter, aerober cellulosezersetzender Bakterien, Cellulobacillus myxogenes n. sp. und Cellulobacillus mucosus n. sp.

Im Folgenden werden die wichtigsten morphologischen und kulturellen sowie mehrere physiologische Eigenschaften zweier mesophiler aerober Cellulosebakterien erläutert, über deren Isolierung ich soeben berichtet habe. Diese Bakterien waren unter den von mir untersuchten verschiedenen, sowohl reinen wie unreinen, aeroben, cellulosezersetzenden Mikroorganismen diejenigen, welche die Cellulose am kräftigsten angriffen und schienen auch den in der Literatur beschriebenen Arten gegenüber in Bezug auf das Zersetzungsvermögen überlegen zu sein, sodass es aussah, als ob

diesen weitverbreiteten Bakterien eine wesentliche Rolle beim aeroben Celluloseabbau zuzuschreiben wäre.

Die Bakterien erwiesen sich als neue, in der Literatur nicht früher beschriebene Arten. Ich habe sie *Cellulobacillus myxogenes n. sp.* und *Cellulobacillus mucosus n. sp.* genannt. Bei der Nomenklatur habe ich diejenige in der bakteriologischen Literatur vorkommende Richtung befolgt, welche bei der Aufstellung der Gattungen neben den morphologischen Eigenschaften auch die physiologischen berücksichtigt. Aus dem Gattungsnamen *Cellulobacillus* geht hervor, dass die Bakterie Cellulose angreift, und dass sie eine sporenbildende Stäbchenbakterie ist. Als Artnamen habe ich die Bezeichnungen *myxogenes* und *mucosus* darum gewählt, weil die beiden Bakterien in zuckerhaltigen Nährmedien eine deutliche Schleimbildung aufweisen. Die Unterscheidung dieser einander sehr ähnlichen Bakterien als zwei Arten gründet sich hauptsächlich auf einige recht charakteristische, unten näher beschriebene, morphologische Merkmale der Bakterien.

1. Zur Methodik.

Um die morphologischen und kulturellen Eigenschaften der Bakterien zu untersuchen und dabei u. a. Kriterien dafür zu erhalten, dass dieselben wirklich als zwei Arten anzusehen sind, habe ich es für notwendig erachtet, das Wachstum der Bakterien auf einer Reihe von festen und flüssigen Nährmedien zu verfolgen, die zum Teil von den üblichen, in der Bakteriologie angewandten Medien abweichend waren. Die benutzten Nährmedien waren folgende:

Feste Nährböden.

1. *Celluloseagar.* Er enthält, wie früher angeführt worden ist, in der Grundnährlösung etwa 0.5 % feinausgefällte Cellulose und 1.5 % Agar. Die übrigen festen Nährböden weisen denselben Agargehalt auf.

2. *Stärkeagar.* Zur Herstellung des Stärkeagars wurde auf

1 l Leitungswasser 5 g Kartoffelmehl zugesetzt, die Mischung in einer Porzellanschale unter häufigem Umrühren bis auf die Hälfte eingedampft und alsdann dem entstandenen Kleister, in 500 ccm Wasser gelöst, die üblichen Nährsalze zugegeben.

3. *Glucose-Nährlösung-Agar.* Enthält in der Grundnährlösung 0.5 % Glucose.

4. *Gewöhnlicher Nähragar.* Enthält 0.5 % Liebigs Fleischextrakt, 1 % Pepton und 0.5 % Natriumchlorid.

5. *Glucose-Nähragar.* Enthält in dem gewöhnlichen Nähragar 0.5 % Glucose.

6. *Gewöhnliche Nährgelatine.* Enthält 0.5 % Liebigs Fleischextrakt, 1 % Pepton, 0.5 % Natriumchlorid und 10 % Gelatine.

7. *Kartoffel.* Auf gewöhnliche Weise vorbereitete Kartoffelscheiben.

Flüssige Nährmedien.

1. *Kulturröhrchen,* welche die Filtrierpapierscheiben in der üblichen Grundlösung enthalten.

2. *Glucose-Nährlösung.* Ist aus der Grundnährlösung und 0.5 % Glucose zusammengesetzt. Oft wurde den Röhrchen etwas Kreide zugegeben.

3. *Gewöhnliche Nährbouillon.* Hat dieselbe Zusammensetzung wie die Grundlösung für den gewöhnlichen Nähragar.

4. *Glucose-Nährbouillon.* Ist aus der gewöhnlichen Nährbouillon und 0.5 % Glucose zusammengesetzt.

5. *Milch.*

Es sei bemerkt, dass die Reaktion des gewöhnlichen Nähragars, der gewöhnlichen Nährgelatine und der gewöhnlichen Nährbouillon mit Hilfe des Phenolrot-Papiers immer auf die Reaktion pH 7.0 eingestellt wurde.

Die Züchtung der Bakterien für die morphologischen sowie die physiologischen Untersuchungen fand bei 37° statt.

Von manchen Bakterien- und Kolonienformen wurden photo-

graphische Aufnahmen gemacht. Die Grösse der verschiedenen Bakterienformen wurde mit einem Okularmikrometer und mit Hilfe der photographischen Aufnahmen gemessen.

Um den Einfluss gewisser spezieller Faktoren, wie der Temperatur, gewisser Nährsalze usw., auf die Bakterientätigkeit zu ermitteln, wurden die Bakterien gewöhnlich auf flüssigen Nährmedien mit Cellulose oder Glucose als Abbausubstrate gezüchtet und dann nach bestimmter Zeit festgestellt, wie viel von den Substraten abgebaut worden war.

Die Versuche mit Cellulose als Abbaumaterial wurden in Erlenmeyerkolben von 500—750 ccm ausgeführt, die 1 g quantitatives Filtrierpapier von Schleicher und Schüll, 0.5 g Calciumcarbonat und 100 ccm der mit etwas Liebigs Fleischextrakt und Pepton versetzten Nährlösung enthielten. Zur quantitativen Bestimmung der Cellulose wurde nach Beendigung des Abbauprozesses der Inhalt des Züchtungskolbens wiederholt durch einen Gooch-Tiegel, der nicht mit Asbest versehen war, filtriert; die auf dem Tiegel angesammelte breiige, Calciumcarbonat enthaltende Papiermasse wurde zuerst zur Lösung des Calciumcarbonats mit verdünnter Salzsäure (1 : 4) behandelt, dann mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und zuletzt bei 105° getrocknet. — Das Filtrieren des Papierbreies ist oft sehr mühsam, denn das etwas schleimige, Bakterien enthaltende Papier hat eine besondere Neigung, die Filter zu verstopfen. Die Analysenmethodik ist nicht ganz einwandfrei, denn die gewogene Papiermasse enthält immer als Verunreinigungen Bakterienkörper und von Bakterien produzierte schleimige Stoffe. Doch ist die Menge der Begleitstoffe der analysierten Cellulose nach einigen eingehenderen Analysen, die im folgenden Teil meiner Untersuchungen wiedergegeben worden sind, so klein und so wenig variierend, dass der Vergleich zwischen den verschiedenen Gliedern der Versuchsreihen auf Grund der mit der geschilderten Methodik erhaltenen Analysenzahlen gestattet sein dürfte.

Die Versuche, in welchen die Glucose als Abbaumaterial diente,

wurden in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt ausgeführt, die mit 0.5 oder 1 g Glucose, 0.5 g Calciumcarbonat und mit 100 ccm der rein mineralischen oder mit etwas Liebigs Fleischextrakt und Pepton versetzten Stammnährlösung beschickt waren. Zur Bestimmung der Glucose wurde die Kulturflüssigkeit, die im Brutschrank durch Verdampfung Wasser verloren hatte, mit Wasser bis auf 100 ccm wieder aufgefüllt und dann 10 ccm der durch Zentrifugieren von festen Bestandteilen befreiten Nährlösung der Zuckerbestimmung nach Bertrand unterworfen.

2. Morphologie und allgemeine kulturelle Eigenschaften der Bakterien.

A. Cellulobacillus myxogenes.

Seinem mikroskopischen Aussehen nach ist *Cellulobacillus myxogenes*, der in Kulturröhrchen auf Cellulosefasern gewachsen ist, ein schlankes, oft ein wenig gekrümmtes, einzeln oder zu zweien liegendes Stäbchen, von 1.4—2.7 μ Länge und 0.3—0.5 μ Breite. Auf den übrigen Nährmedien sind die Stäbchen gewöhnlich etwas plumper und grösser; die Länge variiert je nach der Beschaffenheit des Nährbodens von 1.0 μ bis 3.8 μ, die Breite von 0.4 μ bis 0.9 μ. Die Variationen der Grösse in verschiedenen Nährmedien gehen aus den bei jedem geprüften Nährmedium angeführten Zahlen hervor. Der Bazillus ist lebhaft beweglich. Bei der Geisselfärbung nach Casares-Gil hat die Bakterie eine peritriche Begeisselung. Die Geisseln, die in einer Anzahl von 6—8 vorkommen, sind wellig gebogen und 3—5 μ lang. Der Bazillus ist mit den gewöhnlichen Anilinfarben gut färbbar. Die Gramfärbung ist negativ. Der Bazillus bildet relativ grosse, ovale Sporen, die sich nach der Sporenfärbungsmethode von Möller gut färben lassen. Die Länge der Sporen beträgt 1.4—3.0 μ, die Breite 0.9—1.5 μ.

Der Bazillus ist obligat aerob. In den mit Pyrogallol und Na-

triumhydroxyd verschlossenen Kulturröhrchen findet auch nach längerer Zeit keine Cellulosezersetzung statt.

Der Bazillus kommt in vermodertem Torfe, in der Ackererde und in Misthaufen vor. Es war bemerkenswert, dass ich diesen Bazillus in einer mit Erde etwas verunreinigten Torfstreuprobe, die sehr lange — wenigstens zehn Jahre — im Bodenraume eines Gebäudes gelegen hatte, als einzigen cellulosezersetzenden Mikroorganismus fand. Die Virulenz des Bazillus war allerdings sehr abgeschwächt.

Feste Nährböden.

Celluloseagar. Kolonienbildung wurde schon nach 24 Stunden beobachtet. Die Kolonien waren sehr charakteristische Gebilde mit scharfrandigem, kreisrunden, grauen Randwall und durchsichtiger Mitte, die nur spärlich Bakterien enthielt. Bei längerem Züchten der Bakterien im Laboratorium begannen die Bakterien Kolonien mit einem unregelmässig buchtigen Randwall zu bilden, welche oft eine fein granulierte, etwas kompakte Mitte hatten. Die Kolonien waren immer von einer durchsichtigen enzymatischen Zone umschlossen. Der Durchmesser der Kolonien betrug nach 3 Tagen 2—4 mm, nach 6 Tagen 3—6 mm; die Breite der umschliessenden Enzymzone war nach 3 Tagen 0.5—3 mm, nach 6 Tagen 2—4 mm. Reichliche Sporenbildung war schon bei 2 Tage alten Kolonien zu beobachten. Die in Kolonien gewachsenen Bakterien waren 1.3—2.8 μ lang und 0.4—0.6 μ dick. Die Länge der Sporen betrug 1.4—2.5 μ, die Breite 0.9—1.2 μ.

Stärkeagar. Kolonienbildung war nach 24 Stunden wahrzunehmen. Die 3 Tage alten, etwa 2—4 mm breiten Kolonien hatten eine Tautropfenform und schleimige Konsistenz. Die 6 Tage alten Kolonien waren rundlich, flach, ziemlich glattrandig, fein gekörnt und hatten eine schwach gelbgefärbte, bisweilen ein wenig eingedrückte Mitte, die durch einen oder zwei Wälle von der bläulichgelben Randzone getrennt war. Obgleich die Kolonien

bisweilen in älteren Kulturen von diesem Grundtypus abwichen, konnten auf derselben Platte verschiedene Kolonienformen nicht unterschieden werden. Schon in 2 Tage alten Kolonien war eine sehr reichliche Sporenbildung zu beobachten. Die Bakterien in den Kolonien waren einzeln oder zu zweien liegende Stäbchen von 1.3—3.2 μ Länge und 0.5—0.7 μ Dicke. Die Sporen hatten eine Länge von 1.5—3.0 μ und eine Dicke von 1.0—1.5 μ.

Glucose-Nährlösung-Agar. Kolonien wurden nach 24 Stunden gebildet. Die Kolonien zeigten sehr unregelmässige Formen. Die 3 Tage alten Kolonien hatten gewöhnlich eine rundliche, flache, etwas unebene, blaugelbe Mitte von 1—3 mm Durchmesser, die von ganz unregelmässig begrenzten, sehr dünnen, längs der Oberfläche auskriechenden Sekundärvegetationen umgeben war. Diese Sekundärkolonien enthaltenden Vegetationen hatten grosse Neigung, sich auszubreiten, sodass nach 4—5 Tagen auf den Platten bis zu 15 mm breite, charakteristische Gebilde entstanden waren. Die Sporenbildung war nicht so reichlich wie auf Cellulose- oder Stärkeagar. Die Bakterien hatten eine Länge von 1.2—3.0 μ und eine Breite von 0.5—0.7 μ. Die Sporen waren 1.4—2.9 μ lang und 0.9—1.3 μ dick.

Gewöhnlicher Nähragar. Gut ausgebildete Kolonien wurden nicht beobachtet. Der Bazillus bildet auf der Oberfläche des Agars so dünne und durchscheinende Häutchen, dass es oft schwer zu unterscheiden war, ob überhaupt irgendein Wachstum stattgefunden hatte. Der Stichkanal ist fadenförmig, rauh, wenig charakteristisch. Die Stichkulturen enthielten neben einer reichlichen Menge Sporen eigentümliche Bakterienformen: dünne, oft gekrümmte, schlecht mit Methylenblau und Karbolfuchsin färbbare Stäbchen von 1.7—3.3 μ Länge und 0.3—0.5 μ Breite, die an beiden Enden ein gut zu färbendes Polkörperchen trugen. Zuerst sah ich diese Formen als Begleitbakterien an, aber es ergab sich später, dass diese Formen von *Cellulobacillus myxogenes* selbst herstammten und dann vorkamen, wenn der Bazillus unter ungünstigen Lebensbedingungen, wie beim Ausschluss von Kohlenhydraten, gewachsen

war. Auf cellulosehaltige Nährmedien übergeimpft, rufen diese Formen eine Cellulosezersetzung hervor.

Glucose-Nähragar. Die gebildeten Kolonien glichen sehr den auf Glucose-Nährlösung-Agar entwickelten Kolonien, waren aber noch viel dünner und entwickelten sich viel träger.

Nährgelatine. Trotz vieler Versuche war auf den Gelatineplatten kein Kolonien-Wachstum zu erhalten. Beim Anlegen von Stichkulturen wurde in den Gelatinestichen bisweilen sofort nach Isolierung des Bazillus ein sehr schwaches Wachstum und zwar die Bildung von zarten Ästchen wahrgenommen, wobei auch die kurz vorher beschriebenen, eigentümlichen Bakterienformen zu beobachten waren. Die Gelatine wurde nicht verflüssigt.

Kartoffel. Kein Wachstum.

Flüssige Nährböden.

Kulturröhrchen. In Kulturröhrchen, die Filtrierpapier in reiner Mineralsalzlösung enthielten, waren die ersten Anzeichen der Cellulosezersetzung nach 3 Tagen zu beobachten. Wurde aber der Kulturflüssigkeit etwa 0.1 % Liebigs Fleischextrakt oder Pepton zugesetzt, so trat die Zersetzung in der Regel schon 30—48 Stunden nach der Impfung auf. Bei längerer Züchtung nahm die Zersetzungsfähigkeit der Bakterien beträchtlich ab, sodass die Bakterien, nachdem sie etwa ein Jahr im Laboratorium gezüchtet worden waren, in einer rein mineralischen Nährlösung die Cellulosezersetzung nicht mehr hervorzurufen imstande waren. In einer Nährlösung, die mit etwas Liebigs Fleischextrakt oder Pepton versetzt war, begann dagegen die Zersetzung des Papiers noch drei Jahre nach der Isolierung des Bazillus am zweiten oder dritten Tage nach Beimpfung. Der Abbau der Cellulose ging genau auf dieselbe Weise vor sich, wie bei den thermophilen Bakterien früher beschrieben worden ist: das Papier bleibt nach Beginn des Abbaues einige Zeit wie unberührt liegen, zerfällt aber dann bei leichtem Schütteln des Rohres oder von selbst in zahllose Fasern.

Eine Lochbildung im Filtrierpapier wurde niemals beobachtet. Die Bakterien auf Filtrierpapier waren Stäbchen von 1.4—2.7 μ Länge und 0.3—0.5 μ Breite. Die Sporenbildung war sehr reichlich und begann gleichzeitig mit der Zersetzung der Cellulose. Die Sporen waren 1.4—2.6 μ lang und 0.9—1.2 μ breit.

Glucose-Nährlösung. Schon nach 15—20 Stunden war eine deutliche Trübung zu beobachten. Nach 48 Stunden hatte sich in den Röhrchen auf der Oberfläche der Nährflüssigkeit ein dickes, schleimiges Häutchen gebildet; die darunter befindliche Flüssigkeit war nur wenig getrübt. Die Bakterien in jungen Kulturen waren einzeln oder zu zweien, aber niemals in Ketten liegende Stäbchen und oft etwas plumper als gewöhnlich. Die Länge betrug 1.0—3.8 μ die Breite 0.4—0.7 μ. Die Bildung von Sporen war schon bei 2 Tage alten Kulturen, wenngleich in sehr viel geringerem Masse als in Papier enthaltenden Kulturröhrchen, erkennbar. In vielen mikroskopischen Präparaten, besonders bei älteren Kulturen, schienen die Bakterien wie von einer dicken Hülle umschlossen zu sein, die auf eine von den Bakterien produzierte, schleimartige Substanz zurückzuführen sein dürfte. In sehr alten Kulturen kamen körnige, etwas an die vorbeschriebenen, eigentümlichen Bakterienformen erinnernde Formen vor. Hier und da traf man dann in älteren Kulturen eine Bildung von kurzen Ketten.

Gewöhnliche Nährbouillon. Der Bazillus rief in der Nährbouillon sofort nach seiner Isolierung eine äusserst schwache, kaum sichtbare Trübung hervor. Die Bakterien waren schlecht färbbare, sehr verkümmerte Stäbchen. Nach etwas längerem Züchten des Bazillus auf künstlichen Medien war keine Trübung mehr zu beobachten. Indol wurde nicht gebildet.

Glucosebouillon. Die Bouillon wird nach 2—3 Tagen mässig getrübt. In älteren Kulturen beobachtet man immer eine deutliche Schleimbildung. Die Bakterien waren etwas schlanker als in Glucose-Nährlösung. Die Länge betrug 1.4—3.2 μ, die Breite 0.4—0.5 μ. Sporenbildung war in jungen Kulturen selten.

Milch. Kein Wachstum.

Wie aus dem Obigen ersichtlich, hat *Cellulobacillus myxogenes* auf vielen Nährböden, auf denen er wächst, grosse Neigung zur Sporenbildung. Am reichlichsten werden die Sporen auf cellulosehaltigen Nährböden gebildet. Im Gegensatz zu anaeroben cellulosezersetzenden Bazillen, die eine endständige Sporenbildung haben, ist bei diesem Bazillus eine *Clostridium*-Bildung zu beobachten. Am besten kann man die Sporenbildung bei jungen, in Glucose-Nährsalzlösung gewachsenen Kulturen verfolgen. Die Stäbchen werden dabei schlecht mit Methylenblau färbbar und ein wenig aufgebläht, und man kann in den Stäbchen eine Granula-Bildung beobachten. In den entstandenen spindelförmigen Gebilden sieht man oft an dem einem Ende ein gut färbbares Körperchen. Daneben trifft man Formen an, die ausserdem an dem anderen Ende ein kleineres, gut verfärbbares Körperchen tragen.

Zur Prüfung der Wärmeresistenz der Sporen wurde eine Serie mit Sporen beimpfter Kulturröhrchen verschieden lange Zeiten auf 100° gehalten. Es stellte sich heraus, dass die Sporen die Temperatur von 100° 4—5 Minuten lang ertrugen. Kurze Erhitzung bei 100° schien die Virulenz der Kulturen oft zu steigern. Der Umstand, dass mir die Isolierung dieses Bazillus aus sehr alten Proben von Torfstreu gelang, zeigt deutlich, dass dieser Bazillus die Trocknung ausgezeichnet erträgt.

Die Aufbewahrung der Reinkulturen für Untersuchungszwecke geschah zuerst im flüssigen Medium, indem der Bazillus wöchentlich in ein frisches, mit Calciumcarbonat versetztes Kulturröhrchen übergeimpft wurde. Weil es sich aber erwies, dass der Bazillus, wie der früher beschriebene thermophile Bazillus, im flüssigen Medium zu degenerieren begann, wurde der Bazillus später in trockener Form aufbewahrt. Dazu liess man die Kolonien auf Cellulose- oder Stärkeagarplatten bei 30° trocknen und legte dann bei Bedarf von den bei Zimmertemperatur aufbewahrten, trocknen Platten Streukulturen auf Celluloseagar an, wonach von den Lösungsfeld-Kolonien in Kulturröhrchen übergeimpft wurde. Durch Impfen der erzielten Kulturen auf den gewöhnlichen Nähragar, die gewöhnliche Nähr-

gelatine, gewöhnliche Nährbouillon und Milch wurde immer kontrolliert, dass die Kulturen wirklich rein waren. Bei Anwesenheit von Begleitbakterien war in der Regel auf irgendeinem von diesen Nährböden ein gutes Wachstum zu beobachten.

Ich habe festgestellt, dass nach dreijährigem Aufbewahren der Bakterien im Laboratorium zwar die Virulenz der Bakterien beträchtlich abgeschwächt und die Form der Kolonien etwas verändert war, dass aber die morphologischen und kulturellen Eigenschaften keine wesentlichen Veränderungen erfahren hatten.

B. . Cellulobacillus mucosus.

Nach seinem mikroskopischen Aussehen ist *Cellulobacillus mucosus*, der auf Cellulosefasern in Kulturröhrchen gewachsen ist, ein schlankes, manchmal ein wenig gekrümmtes, einzeln oder zu zweien liegendes Stäbchen von 1.3—2.8 μ Länge und 0.3—0.5 μ Breite, das unmöglich mikroskopisch von dem auf Cellulosefasern gewachsenen *Cellulobacillus myxogenes* zu unterscheiden ist. Auf anderen Nährmedien ist *Cellulobacillus mucosus* wie *Cellulobacillus myxogenes* grösser und oft etwas plumper. Auf Kartoffel bildet er, zum Unterscheid von *Cellulobacillus myxogenes*, der nicht auf Kartoffel wächst, eigentümliche dicke Ketten von Bakterienzellen von etwa 5—20 μ Länge und 0.8—1.1 μ Breite. Die bei dem vorigen Bazillus vorkommenden, eigentümlichen, Körperchen enthaltenden Formen wurden nicht beobachtet. Der Bazillus ist lebhaft beweglich und hat nach der Geisselfärbung von Casares-Gil eine peritriche Begeisselung. Er färbt sich ziemlich gut mit den gewöhnlichen Anilinfarben. Die Gramfärbung ist negativ. Er bildet relativ grosse, ovale Sporen, die sich nach der Sporenfärbungsmethode von Möller gut färben lassen. Die Länge der Sporen ist 1.4—2.8 μ, die Breite 0.9—1.4 μ.

Der Bazillus ist obligat aerob. In den mit Pyrogallol und Natriumhydroxyd verschlossenen Kulturröhrchen ist auch nach längerer Zeit keine Cellulosezersetzung zu beobachten. Er kommt in vermodertem Torfe und Erde vor.

Feste Nährböden.

Celluloseagar. Die Kolonien wurden nach 48 Stunden sichtbar. Es waren rundliche, sehr flache, oft ein wenig gebuchtete, graue Gebilde, die wegen des Fehlens eines scharfbegrenzten Randwalls und wegen ihrer gut ausgebildeten, oft Sekundärkolonien enthaltenden Mitte leicht von Kolonien des *Cellulobacillus myxogenes* zu unterscheiden waren. Der Durchmesser der Kolonien betrug nach 3 Tagen 2—3.5 mm, nach 6 Tagen 3—5 mm. Die Breite der die Kolonien umschliessenden, durchsichtigen Zone war nach 3 Tagen 0.5—3 mm, nach 6 Tagen 1—3.5 mm. Die tiefer liegenden Kolonien waren kleine, weisse, kompakte, von einer durchsichtigen Zone umschlossene Gebilde. Die in Kolonien gewachsenen Bakterien waren 1.3—2.8 μ lang und 0.4— 0.6 dick. Schon bei jungen Kolonien war eine reichliche Sporenbildung zu beobachten. Die Sporen waren von 1.4—2.5 μ Länge und 0.9—1.3 μ Breite

Stärkeagar. Die Kolonien wurden sichtbar nach 24 Stunden. Die jungen Kolonien waren wie *bei Cellulobacillus myxogenes* tautropfenförmig und von schleimiger Konsistenz. Die älteren, etwa 6 Tage alten Kolonien waren rundliche, etwas erhabene, fettglänzende, schleimige, ganzrandige, weissgraue Gebilde von etwa 3 - 4.5 mm Durchmesser. Bei schwacher Vergrösserung konnten bei ihnen konzentrische Ringe und eine radiäre Streifung beobachtet werden. Daneben traf man oft bei ihnen Sekundärkolonien an. Die Bakterien waren in jüngeren Kolonien etwas plumpe Stäbchen von 1.3—2.8 μ Länge und 0.5—0.8 μ Breite. Bei älteren Kolonien bildeten sie kurze Ketten. Die Sporenbildung war nicht besonders reichlich.

Glucose-Nährlösung-Agar. Die Kolonien kamen nach 24 Stunden zum Vorschein. Im Gegensatz zu den Kolonien von *Cellulobacillus myxogenes* waren diese Kolonien von regelmässiger Form, rundlich, mitteldick und ziemlich glattrandig; die Farbe war bläulichgelb, die Oberfläche uneben mit einem gut begrenzten, etwas dunkler gefärbten Mittelteil. Die Bakterien waren in jungen Ko-

lonien etwas plumpe Stäbchen von 1.2—2.4 μ Länge und 0.5—0.8 μ Breite. In etwas älteren Kolonien bildeten sie oft kurze Ketten von etwa 4—8 μ Länge. Sporenbildung war nur hier und da in älteren Kulturen zu beobachten. Die Sporen waren 1.8—2.8 μ lang und 1—14. μ breit.

Gewöhnlicher Nähragar. Im Gegensatz zum vorbeschriebenen Bazillus wurden auf gewöhnlichem Agar nach 3—4 Tagen gut ausgebildete Kolonien entwickelt. Die 3—4 Tage alte Kolonien waren sehr kleine, rundliche, etwas erhabene, fettglänzende, glatte, bläuliche Gebilde von 1—2 mm Durchmesser. Die Bakterien lagen einzeln oder zu zweien und waren oft ziemlich plump. Die Länge betrug 1.1—2.8 μ, die Dicke 0.4—0.6 μ. Körperchen enthaltende Formen wurden nicht beobachtet. Sporenbildung trat nur in älteren Kolonien hervor.

Glucose-Nähragar. Die Kolonien kamen nach 2 Tagen zum Vorschein. Sie waren rundlich mitteldick, glattrandig, weissblau, auch nach längerem Wachstum ohne besondere Struktur. Die Breite war nach 3 Tagen 2—3.5 mm, nach 6 Tagen 4—6 mm. Die Bakterien in den Kolonien waren grösser als diejenigen, die auf gewöhnlichem Nähragar gewachsen waren. Sie hatten eine Länge von 1.7—3.2 μ und eine Breite 0.5—0.7 μ. Sporenbildung wurde nur hier und da in alten Kolonien beobachtet.

Nährgelatine. Auf Gelatineplatten war auch nach längerer Zeit keine Kolonienbildung zu beobachten. Beim Anlegen von Stichkulturen wurde bisweilen nach einer längeren Zeit im Stichkanal ein zartes, fadenförmiges Wachstum beobachtet, wobei die Gelatine nicht verflüssigt wurde. Beim längeren Züchten des Bazillus in künstlichen Medien wurde in Gelatinestichen kein Wachstum mehr wahrgenommen.

Kartoffel. Nach 2—3 Tagen wurden auf Kartoffeln grangelbe, schleimige Massen gebildet. Die auf Kartoffeln gewachsenen Bakterien waren sehr grosse, plumpe Stäbchen, die eigentümliche, gekrümmte, homogene Ketten bildeten, bei denen die Grenzen zwischen den einzelnen Bakterien kaum sichtbar waren. Die Bak-

terien waren von 2.2—4.5 μ Länge und von 0.8—1.1 μ Dicke. Die Ketten waren bis 20 μ lang. Sporen wurden nicht gebildet.

Flüssige Nährböden.

Kulturröhrchen. Die Fähigkeit, Cellulose zu zersetzen, ist bei *Cellulobacillus mucosus* bedeutend schwächer als bei *Cellulobacillus myxogenes*. Die Zersetzung der Cellulose begann in der rein mineralischen Nährlösung erst nach 6—7 Tagen und in der mit Liebigs Fleischextrakt und Pepton versetzten Nährlösung nach 2 Tagen. Wenn der Bazillus kurze Zeit auf künstlichen Nährböden gezüchtet worden war, ging ihm die Fähigkeit, Cellulose in rein mineralischer Nährlösung zu zersetzen, total verloren. In den mit etwas Liebigs Fleischextrakt und Pepton versetzten Kulturröhrchen konnte dagegen mit dem Bazillus sogar 3 Jahre nach seiner Isolierung eine deutliche Zersetzung des Filtrierpapiers erzielt werden, wenngleich die Inkubationszeit der Zersetzung sehr verlängert war. — Das Filtrierpapier erfährt beim Abbauvorgang dieselbe äusserliche Veränderung, wie früher beschrieben worden ist. Wie erwähnt, ist *Cellulobacillus mucosus*, wenn er auf Cellulosefasern gewachsen ist, morphologisch dem *Cellulobacillus myxogenes* vollkommen ähnlich.

Glucose-Nährlösung. Nach 24 Stunden war eine Trübung sichtbar und nach 2—3 Tagen hatte sich, wie bei dem vorigen Bazillus, an der Oberfläche der Flüssigkeit ein schleimiges Häutchen gebildet. Die Bakterien waren in jungen Kulturen einzeln oder zu zweien liegende, oft etwas plumpe Stäbchen von 1.3—3.8 μ Länge und von 0.5—0.8 μ Breite. In etwas älteren Kulturen wurde die Bildung von ganz kurzen Ketten beobachtet. Sporen wurden nur spärlich gebildet.

Nährbouillon. Die Bouillon wurde nach 3 Tagen äusserst wenig getrübt. Die Bakterien waren verkümmerte Stäbchen. Indol wurde nicht gebildet.

Glucose-Nährbouillon. Die Bouillon wurde nach 2 Tagen gleich-

mässig getrübt. Die Bildung eines Häutchens fehlte gewöhnlich. Die Bakterien waren etwas schlanker als in Glucose-Nährlösung. Die Länge betrug 1.4—3.2 μ, die Breite 0.5—0.6 μ. Sporenbildung wurde nicht beobachtet.

Milch. Kein Wachstum.

Die Bildung der Sporen fand nach demselben Typus wie bei dem vorigen Bazillus statt. Die Sporen ertrugen die Temperatur von 100° ebenso lang, nämlich 4—5 Min. Nach dreijähriger Aufbewahrung des Bazillus im Laboratorium war die Virulenz des Bazillus viel mehr als diejenige des vorigen Bazillus abgeschwächt.

Betreffend die Reinheit dieses, sowie auch des vorigen Mikroorganismus, möchte ich hervorheben, dass die Überimpfungen von allen beschriebenen Kolonientypen und von allen in flüssigen Medien gewachsenen Kulturen, die durch Beimpfung der festen und flüssigen Nährmedien mit diesen Mikroorganismen erzielt worden waren, ohne Ausnahme eine Cellulosezersetzung sowohl in Kulturröhrchen als auch auf Celluloseagar hervorriefen. Ich habe diese Bakterien durch viele sukzessive Streukulturen auf den beschriebenen, cellulosefreien, festen Nährböden in vielen Generationen kultiviert und habe festgestellt, dass die Kolonien immer die gleichen morphologischen Merkmale aufwiesen und dass sie immer mikroskopisch homogene Bakterienformen von bestimmtem Typus enthielten, die, trotzdem sie lange Zeit ohne Cellulose als Kohlenstoffquelle zu wachsen gezwungen waren, im festen wie flüssigen Medium eine kräftige Cellulosezersetzung hervorriefen. — Ein Beweis für die Reinheit der von mir studierten Kulturen der beiden Bakterien ist im übrigen der Umstand, dass, wie ich im anderen Teil meiner Untersuchungen darlegen werde, alle meine zahlreichen Analysen über die Abbauprodukte der Cellulose wie der Glucose, miteinander qualitativ und quantitativ sehr gut übereinstimmten, was kaum zu erwarten wäre, wenn sich an den Abbauprozessen zwei oder mehrere Mikroorganismen beteiligten.

Obgleich ich die Bakterien nicht mittels der Einzellmethode

von Burri reingezüchtet habe, halte ich die angeführten Tatsachen für ausreichend, um zu beweisen, dass ich diese Bakterien in wirklichen Reinkulturen in Händen gehabt habe.

3. Einfluss einiger spezieller Faktoren auf die Bakterientätigkeit.

A. Einfluss der Temperatur.

Um die Abhängigkeit der Bakterientätigkeit von der Temperatur orientierender Weise zu ermitteln, wurden Streukulturen von beiden untersuchten Bakterien auf Celluloseagarplatten angelegt und die Plattenserien bei verschiedenen Temperaturen bebrütet. Es wurde dann festgestellt, nach welcher Zeit deutliche Kolonien auf den Platten gebildet wurden. Gleichzeitig wurde die Cellulosezersetzung in den beimpften Kulturröhrchen bei denselben Temperaturen verfolgt. Der Beginn einer deutlichen Cellulosezersetzung war nach folgenden Zeiten zu beobachten:

Tabelle I.

Temperatur	15°	20°	25°	30°	37°	42°	44°	46°
	Cellulobacillus myxogenes							
Kolonienbildung nach Tagen	6	4	3	2	2	2	3	—
Beginn der Zersetzung in Kulturröhrchen nach Tagen ..	7	4	3	2	2	2	4	—
	Cellulobacillus mucosus							
Kolonienbildung nach Tagen	6	4	3	2	2	2	4	—
Beginn der Zersetzung in Kulturröhrchen nach Tagen ..	8	5	3	2	2	2	4	—

Wie ersichtlich, liegt nach diesen dem Aussehen nach geschätzten Versuchen, der für den Celluloseabbau günstigste Temperaturintervall für die beiden Bakterien zwischen 30° und 42°. Bei 46° fand kein Abbau mehr statt.

Es wurde dann versucht für den *Cellulobacillus myxogenes* ein schärfer begrenztes Temperaturoptimum zu ermitteln. Dazu wurde

eine Versuchserie angestellt, in welcher der Zersetzungsgrad der Glucose bei verschiedenen Temperaturen nach der früher beschriebenen Methodik nach bestimmter Zeit quantitativ bestimmt wurde. Bei jeder Temperatur wurde der Abbau in zwei Ansätzen verfolgt und aus den erhaltenen Analysenwerten das Mittel berechnet. Die Bebrütungszeit der beimpften Kolben war 7 Tage.

Tabelle II.

Temperatur	20°	25°	30°	33°	37°	42°	44°	46°
Glucoseschwund	230	312	406	381	391	399	200	—
nach 7 Tagen in mg	212	320	390	381	377	372	232	—
Mittel	221	316	398	381	384	386	216	—
Relat. Abbaugeschw.	**56**	**79**	**100**	**96**	**97**	**97**	**54**	—

Wie man sieht, liegt der für den Abbau der Glucose günstigste Intervall zwischen 30° und 42°. Ein ausgeprägtes Optimum war auch mit dieser verfeinerten Methodik nicht festzustellen.

B. Einfluss der Reaktion des Nährmediums.

Beimpft man ein Filtrierpapier enthaltendes Kulturröhrchen, das nicht mit Calciumcarbonat beschickt ist, mit dem einen oder anderen der untersuchten Bazillen, so beobachtet man, dass beim Sauerwerden des Nährmediums die anfangs kräftige Bakterientätigkeit schnell stehen bleibt. Die Endreaktion der Flüssigkeit ist nach Beendigung des Abbauprozesses im allgemeinen pH 5.6—5.7. Bei Anwendung der Glucose als Nährsubstrat wurde bei *Cellulobacillus myxogenes* die Endreaktion von pH 5.5, bei *Cellulobacillus mucosus* die Endreaktion von pH 5.6 erhalten. Die Bakterien sind also relativ säureempfindlich.

Um die Abhängigkeit der Bakterien von der Reaktion näher klarzulegen, wurden mit Hilfe von Phosphatmischungen feste und flüssige Nährböden von verschiedener Reaktion bereitet. Nach längeren Vorversuchen wurde für Nährböden eine Grundlösung von folgender Zusammensetzung zur Anwendung gebracht:

$NaNO_3$	2.0 g
$MgSO_4$	0.5 „
Fleischextrakt	0.5 „
Pepton	0.5 „
Phosphatlösung	1000.0 ccm

Die Phosphatlösung war eine $^1/_{45}$ mol. Mischung von primärem Kaliumphosphat und sekundärem Natriumphosphat. Eine höhere PO_4-Konzentration wirkte schädlich auf die Tätigkeit der Bakterien. Eine niedrigere Konzentration pufferte nicht genügend. Ammoniumsulfat konnte wie gewöhnlich als Stickstoffquelle darum nicht verwendet werden, weil das Entweichen des Ammoniaks in alkalischer Reaktion beim Sterilisieren grosse Verschiebungen in den pH-Werten verursacht.

Es wurden dann insgesamt 14 Lösungen bereitet, deren Reaktionen mit Abweichung von etwa 0.2—0.3 pH zwischen pH 5.0 und 9.0 lagen. Diese Nährlösungen wurden zur Herstellung von Filtrierpapier enthaltenden Kulturröhrchen und Celluloseagar verschiedener Reaktion benutzt. Nach dem Sterilisieren wurde potentiometrisch und mit Hilfe von Indikatorpapieren kontrolliert, welche Endreaktion die Nährmedien erhalten hatten.

Nach dem Anlegen von Plattenkulturen auf dem verschiedenen Celluloseagar und dem Beimpfen von Kulturröhrchen wurde dann festgestellt, dass auf festen wie flüssigen Medien auf der sauren Seite die Grenze für das Wachstum des *Cellulobacillus myxogenes* bei pH 5.9 und auf der alkalischen bei pH 8.4 liegt. Die Grenzen für das Wachstum des *Cellulobacillus mucosus* waren fast dieselben, pH 6.1 und 8.4. Die Bildung der Kolonien auf dem Celluloseagar und die Papierzersetzung in den Kulturröhrchen begannen bei allen zwischen pH 5.9 und 8.4 liegenden Reaktionen relativ gleichmässig nach 3 Tagen. Die Begrenzung eines schärferen optimalen pH-Gebietes war nach dieser Methodik unmöglich.

Statt Cellulose wurde auch Glucose in Kulturröhrchen als Abbausubstrat verwendet. Es wurde festgestellt, dass die Grenzen des Wachstums dann bei *Cellulobacillus myxogenes* zwischen pH 5.7 und

8.5, bei *Cellulobacillus mucosus* zwischen pH 5.9 und 8.5 liegen. Nach dem Aussehen zu urteilen, war das Wachstum der beiden Bakterien nach 3 Tagen in Kulturröhrchen von der Reaktion pH 6.5—7.5 am stärksten.

Später wurde auch versucht, die Abhängigkeit des Bakterienwachstums exakter durch Bakterienzählungen nach der Methode von Skar zu ermitteln. Zu diesem Zwecke wurde *Cellulobacillus myxogenes* in einer Reihe von Erlenmeyerkolben von 100 ccm gezüchtet, die in 40 ccm Nährlösung von verschiedenem pH 0.5 % Glucose enthielten. Nach Bebrütung von 3 Tagen wurden für die Bakterienzählungen nach kräftigem Durchschütteln 5 ccm der Kulturflüssigkeit in trockene Proberöhrchen hineinpipettiert und mit 0.2 ccm Methylenblaulösung und 0.8 ccm Milch versetzt. Die Röhrchen wurden durchgeschüttelt und 15 Minuten in einem Wasserbade bei 75° erwärmt. Nach Abkühlen wurden Zählpräparate auf Objektgläsern fertiggestellt. Es wurden 30 Gesichtsfelder gezählt und aus dem Mittelwerte die Zellenzahl pro 1 ccm Kulturflüssigkeit berechnet. In der folgenden Tabelle sind die Resultate wiedergegeben.

Tabelle III.

pH der Nährlösung	5.5	5.7	5.9	6.2	6.5	6.8	7.0	7.3	7.5	8.0	8.4	9.0
Zellenzahl in ccm Kulturflüssigkeit, ausgedrückt in Millionen	—	2.8	3.1	8.1	12.1	10.2	12.4	11.3	14.1	9.0	5.0	—

Wie ersichtlich, liegt dass Wachstumsoptimum des *Cellulobacillus myxogenes* in glucosehaltiger Nährlösung innerhalb des Bereiches von pH 6.5—7.5, also bei etwa neutraler Reaktion.

Ich möchte hervorheben, dass die Bakterien in den erörterten Versuchen unter relativ ungünstigen Bedingungen (hohe Phosphatkonzentration) leben mussten. Es ist möglich, dass die Bakterien

unter in jeder Hinsicht günstigen Verhältnissen in der Natur auch bei etwas saurerer Reaktion den Celluloseabbau hervorrufen können.

C: Anorganische Salze als Nährstoffe.

Die folgenden Versuchsserien hatten das Ziel, durch planmässige Veränderung des Nährmediums klarzulegen, welchen Einfluss verschiedene anorganische Salze auf das Leben der Bakterien ausüben. Daneben verfolgte ich den rein praktischen Zweck, ein Nährmedium zu finden, das möglichst einfach zusammengesetzt und für meine chemischen Untersuchungen der Abbauprodukte gut geeignet wäre, auf welchem jedoch die Bakterien üppig gediehen. Es hatte sich nämlich bei meinen chemischen Versuchen gezeigt, dass das Isolieren gewisser Abbauprodukte aus der früher angeführten Nährlösung, obgleich sie relativ einfach zusammengesetzt war, wegen gewisser darin enthaltener Mineralsalze mit sehr grossen Schwierigkeiten verknüpft war.

Zu den Versuchen wurde für beide Bakterien als Abbausubstrat Cellulose resp. Glucose verwendet. Sämtliche geprüften Nährlösungen waren, um den Abbau zu beschleunigen, mit 0.05 % Liebigs Fleischextrakt und 0.05 % Pepton versetzt. Bei den Versuchen, in welchen die Glucose als Substrat diente, wurde, um die Zuverlässigkeit der Versuche zu erhöhen, der Abbau in zwei Ansätzen mit demselben Inhalt verfolgt und aus den erhaltenen Analysenwerten das Mittel berechnet.

Die ersten Versuchsserien wurden in der Weise ausgeführt, dass die Zusammensetzung der üblichen, von mir gebrauchten Nährlösung, die gleichzeitig als Vergleichslösung diente, in Bezug auf die Konzentration und den Gehalt an Phosphat, Magnesiumsulfat und Natriumchlorid variiert wurde, wie die folgende Tabelle zeigt. Die Reaktion der Nährlösungen von höherer Phosphatkonzentration wurde vor dem Sterilisieren mit Salzsäure auf pH 7.0 eingestellt.

Tabelle

Nährsalze in 1 l Leitungswasser, 0.05% Pepton u. 0.05% Fleischextr. enthaltend	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 1., $MgSO_4$ 0.5., NaCl 0.5,,	$(NH_4)_2SO_4$ 1g K_2HPO_4 0.5,, $MgSO_4$ 0.25,, NaCl 0.25,,	$(NH_4)_2SO_4$ 4g K_2HPO_4 2,, $MgSO_4$ 1,, NaCl 1,,	$(NH_4)_2SO_4$ 2g — $MgSO_4$ 0.5,, NaCl 0.5,,	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 2,, $MgSO_4$ 0.5,, NaCl 0.5,,
					Cellulobacillus
Celluloseschwund nach 17 Tagen in mg.	327	289	215	341	328
Relat. Abbaugeschw.	**96**	**85**	**63**	**100**	**96**
Glucoseschwund nach 6 Tagen in mg	311	240	150	312	311
	332	244	163	291	307
Mittel	321	242	157	301	309
Relat. Abbaugeschw.	**96**	**72**	**47**	**90**	**93**
					Cellulobacillus
Celluloseschwund nach 21 Tagen in mg	281	246	189	284	291
Relat. Abbaugeschw.	**97**	**85**	**65**	**98**	**100**
Glucoseschwund nach 9 Tagen in mg	397	295	213	339	387
	380	277	199	331	387
Mittel	389	286	206	335	387
Relat. Abbaugeschw.	**100**	**74**	**53**	**86**	**99**

IV.

$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 5„ $MgSO_4$ 0.5„ NaCl 0.5„	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 10„ $MgSO_4$ 0.5„ NaCl 0.5„	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 20„ $MgSO_4$ 0.5„ NaCl 0.5„	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 1„ — NaCl 0.5„	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 1„ $MgSO_4$ 0.5„ —	$(NH_4)_2SO_4$ 2g K_2HPO_4 1„ $MgSO_4$ 0.5„ NaCl 2„
myxogenes					
301	200	Kein Wachstum	281	332	337
88	**59**		**82**	**97**	**99**
320	145	Kein Wachstum	278	316	337
308	160		284	306	331
314	153		281	311	334
94	**46**		**84**	**93**	**100**
mucosus					
247	149	Kein Wachstum	252	285	274
85	**51**		**87**	**98**	**94**
309	208	Kein Wachstum	301	387	375
280	200		329	361	375
295	204		315	375	375
76	**52**		**81**	**96**	**96**

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Salzkonzentration in der üblichen Nährlösung, 0.1 %, für die Tätigkeit der beiden Bakterien sowohl bei Cellulose als auch bei Glucose als Substrat am geeignetsten war. Durch Verdoppelung der Salzkonzentration wurde die Zersetzung der Cellulose wie auch der Glucose bei beiden Bakterien deutlich herabgesetzt. Die Verminderung der Konzentration bis auf die Hälfte wirkte weniger schädlich.

Das zugesetzte Phosphat hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit der Cellulose und Glucose. Es erwies sich nämlich, dass schon die in dem zugesetzten Fleischextrakt und Pepton enthaltenen sehr kleinen Mengen von Phosphorverbindungen den Bedarf der Bakterien an Phosphor decken können. Die bei *Cellulobacillus mucosus* erhaltenen Resultate, wenn Glucose als Abbausubstrat diente, können vielleicht so gedeutet werden, dass der Zusatz von 0.1—0.2 % Kaliumphosphat den Abbau der Glucose gefördert hat. Im übrigen hatte das zugesetzte Phosphat keinen fördernden Einfluss. Höhere Konzentrationen des Phosphats wirkten vielmehr von 0.5 % an aufwärts hemmend. In einer 2 %-igen Phosphatlösung fand kein Bakterienwachstum statt. Dasselbe ist andererseits der Fall, wie in anderem Zusammenhange festgestellt wurde, wenn man der Nährlösung keine phosphorhaltigen Stoffe zugibt und den Bakterien so nur die im Leitungswasser enthaltene winzige Menge von Phosphor zur Verfügung steht.

Der Zusatz von Magnesiumionen als 0.05 % Magnesiumsulfat hatte bei beiden Bakterien, wenngleich keine grosse, so doch eine deutliche, günstige Wirkung.

Natriumchlorid dagegen schien in den angewandten Konzentrationen von 0.05 % und 0.2 % keinen deutlichen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit der Substrate auszuüben, sodass seine Anwendung in der Nährlösung beim Züchten wenigstens dieser Cellulosezersetzer ganz unnötig ist.

Auf Grund dieser Resultate sah es also aus, als ob für das Wachstum dieser Bakterien von den anorganischen Salzen fast ausschliesslich die assimilierbaren Stickstoffsalze wesentlich wären.

Tabelle V.

Nährsalze in 1 l Leitungswasser, 0.05% Pepton und 0.05% Fleischextr. enthaltend	$(NH_4)_2SO_4$ 2 g K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0.5 „ NaCl 0.5 „	NH_4Cl 2 g K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0.5 „ NaCl 0.5 „	$NaNO_3$ 2 g K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0.5 „ NaCl 0.5 „	KNO_3 2 g K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0.5 „ NaCl 0.5 „	$NaNO_3$ 1 g KNO_3 1 „ K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0,5 „ NaCl 0.5 „	NH_4NO_3 2 g K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0,5 „ NaCl 0.5 „	— K_2HPO_4 1 g $MgSO_4$ 0.5 „ NaCl 0.5 „
	Cellulobacillus myxogenes						
Celluloseschwund	328	346	351	348	385	298	
nach 17 Tagen in mg	316	328	353	339	355	300	Kein Wachstum
Mittel	322	337	352	344	370	299	
Relat. Abbaugeschw.	**87**	**91**	**95**	**93**	**100**	**81**	
Glucoseschwund	312	321	380	351	372	290	
nach 6 Tagen in mg	292	—	376	351	354	272	Kein Wachstum
Mittel	302	321	378	351	363	281	
Relat. Abbaugeschw.	**80**	**85**	**100**	**93**	**96**	**74**	
Glucoseschwund	410	430	471	460	432	400	
nach 8 Tagen in mg	418	428	449	448	450	372	Kein Wachstum
Mittel	414	429	460	454	441	386	
Relat. Abbaugeschw.	**90**	**93**	**100**	**99**	**98**	**84**	
	Cellulobacillus mucosus.						
Celluloseschwund	256	273	306	280	330	257	
nach 21 Tagen in mg	280	278	298	292	302	273	Kein Wachstum
Mittel	268	276	302	286	316	265	
Relat. Abbaugeschw.	**85**	**87**	**96**	**91**	**100**	**84**	

Um Aufschluss darüber zu erhalten, in welchem Masse die anorganischen Salze als Stickstoffquellen dienen können, wurde eine Versuchsserie ausgeführt, worin Ammoniumsalze und Nitrate als Stickstoffquellen miteinander verglichen wurden. Als Abbausubstrat wurde bei *Cellulobacillus myxogenes* Cellulose resp. Glucose angewandt. Mit Glucose als Abbausubstrat wurden zwei Versuchsserien ausgeführt. Bei *Cellulobacillus mucosus* wurde nur Cellulose als Abbausubstrat angewandt. Die Zusammensetzung der Nährböden und die Resultate gehen aus der Tabelle V hervor.

Aus der Tabelle erhellt, dass von den Ammoniumsalzen Ammoniumsulfat und Ammoniumchlorid etwa den gleichen Einfluss auf den Abbau der Substrate haben, das letzte vielleicht wenigstens bei *Cellulobacillus myxogenes* einen etwas günstigeren. Neben Ammoniumsalzen sind Nitrate gut verwertbar, und zwar war die Abbaugeschwindigkeit bei Natriumnitrat und Kaliumnitrat als Stickstoffquelle bei beiden Bakterien deutlich grösser als bei den erwähnten Ammoniumsalzen. Es war eigentümlich, dass Ammoniumnitrat, obgleich es zwei verwertbare Stickstoffgruppen enthält, dem Kohlenhydratabbau weniger förderlich war. Ohne Zusatz der anorganischen Stickstoffsalze fand in der mit 0.05 % Fleischextrakt und 0.05 % Pepton versetzten Nährlösung kein Bakterienwachstum statt.

Die vergleichenden Versuche mit diesen anorganischen Stickstoffquellen wurden nochmals wiederholt und zwar unter etwas veränderten Bedingungen. Es wurden nämlich zu diesen Versuchen solche Nährmedien anzuwenden versucht, die neben einer winzigen Menge von Liebigs Fleischextrakt und Pepton als Nährstoffe nur Ammoniumsalze oder Nitrate enthielten. Bei Ammoniumsulfat und Natriumnitrat wurde gleichzeitig auch der Einfluss der Konzentration der Untersuchung unterzogen. Zum Vergleich wurden auch Versuche in üblicher Nährlösung angestellt. In den Versuchen wurde nur *Cellulobacillus myxogenes* als Versuchsobjekt verwendet. Als Abbausubstrate dienten Cellulose und Glucose.

Tabelle VI.

Nährsalze in 1 l Leitungswasser, 0.05 % Pepton und 0.05 % Fleischextrakt enthaltend	$(NH_4)_2SO_4$ g					NH_4Cl g	NH_4NO_3 g	$NaNO_3$ g			KNO_3 g	$(NH_4)_2SO_4$ 2 g K_2HPO_4 1 „ $MgSO_4$ 0.5 „ NaCl 0.5 „
	1	2	3	4	6	3	3	1	3	6	3	
Celluloseschwund	206	277	288	292	195	300	259	240	311		298	308
nach 15 Tagen in mg	226	261	281	282	220	282	245	261	300		296	320
Mittel	216	269	285	287	208	291	252	251	306		297	314
Relat. Abbaugeschw.	**69**	**86**	**91**	**91**	**66**	**93**	**80**	**80**	**97**		**95**	**100**
Glucoseschwund	350	353	368	374	290	399	342	390	447	315	422	452
nach 7 Tagen	332	353	382	352	319	399	360	402	431	345	430	438
Mittel	341	353	375	363	305	399	351	396	439	330	426	445
Relat. Abbaugeschw.	**77**	**79**	**84**	**81**	**69**	**90**	**80**	**89**	**99**	**74**	**96**	**100**

Wie ersichtlich, findet in allen geprüften, sehr einfach zusammengesetzten Nährlösungen ein relativ kräftiger Kohlenhydratabbau statt. Das übliche, zum Vergleich dienende, etwas komplizierte Nährmedium scheint in dieser Hinsicht jenen möglichst einfachen Nährmedien nur relativ wenig überlegen zu sein. Hinsichtlich ihres Einflusses auf den Kohlenhydratabbau ist die Reihenfolge der verschiedenen anorganischen Nährsalze etwa dieselbe wie die in der früheren Versuchsserie: Natriumnitrat, Kaliumnitrat, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat. Was die Konzentration anbelangt, so war der kräftigste Abbau bei einem Gehalt von 0.3—0.4 % Ammoniumsulfat oder 0.3 % Natriumnitrat zu beobachten.

Es sei erwähnt, dass in den nitrathaltigen Nährlösungen, worin diese Bakterien gewachsen waren, niemals eine Bildung von Nitriten festzustellen war. Die in einigen Fällen beobachtete positive Nitritreaktion war auf eine zufällige Infektion mit Begleitbakterien zurückzuführen. Ebensowenig kann man in nitrathaltigen Nährlösungen eine Bildung von Ammoniak nachweisen.

D. Einfluss einiger organischer, stickstoffhaltiger Stoffe.

Wie früher oft hervorgehoben, hat ein winziger Zusatz von Liebigs Fleischextrakt und Pepton in den sonst rein mineralischen Nährlösungen einen sehr günstigen Einfluss auf die Tätigkeit der Bakterien, obgleich diese Stoffe allein nicht als Stickstoffquelle dienen können. Um diese merkwürdige Erscheinung etwas eingehender zu studieren, wurden sofort nach der Isolierung des *Cellulobacillus myxogenes* und *mucosus* Versuchsserien ausgeführt, in welchen der Einfluss von Liebigs Fleischextrakt und Pepton in verschiedenen Konzentrationen geprüft wurde. Als Grundlösung diente die übliche Nährlösung, als Abbausubstrat bei *Cellulobacillus myxogenes* sowohl Cellulose als auch Glucose und bei *Cellulobacillus mucosus* nur Cellulose. Die Konzentration der geprüften Stoffe variierte von 0.05 % bis zu 2 %. Bei einigen Versuchen wurde Liebigs Fleischextrakt zusammen mit Pepton verwendet. Die Resultate und die Anordnung der Versuche gehen aus der Tabelle VII hervor.

Die Versuche zeigen, dass der Zusatz von Liebigs Fleischextrakt und Pepton zu der rein mineralischen Salzlösung schon von 0.05 % aufwärts sowohl bei *Cellulobacillus myxogenes* als bei *Cellulobacillus mucosus* den Abbau der Cellulose wie Glucose fördert. Bei *Cellulobacillus myxogenes* ist die günstigste Konzentration von Liebigs Fleischextrakt sowie von Pepton 0.1—0.3 %; bei *Cellulobacillus mucosus* ist sie etwas höher, nämlich 0.3—0.5 %. In den Nährlösungen, die Liebigs Fleischextrakt oder Pepton zu 1.5 % oder 2 % enthielten, war der Abbau beider Substrate deutlich schwächer als in der zum Vergleich dienenden, rein mineralischen Nährlösung. Beim Vergleich der geprüften Stoffe miteinander hat es bei *Cellulobacillus myxogenes* den Anschein, als ob Pepton bei der gleichen Konzentration eine etwas günstigere Wirkung als Liebigs Fleischextrakt ausübe. Bei *Cellulobacillus mucosus* waren sich die beiden Stoffe ziemlich gleichwertig. Es scheint ferner, als ob diese Stoffe wenn man sie den Bakterien gleichzeitig zusetzt, einen günstigeren

Tabelle VII.

Zusammensetzung d. Grundnährlösung: $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, K_2HPO_4 1.0 „, $MgSO_4$ 0.5 „, NaCl 0.5 „, Leitungswasser 1000.0	Grundnährlösung mit Fleischextrakt %						Grundnährlösung mit Pepton %						Grundnährlösung mit Fleischextrakt und Pepton %		Ohne Zusatz
	0.05	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0	0.05	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0	0.05	0.15	
	Cellulobacillus myxogenes														
Celluloseschwund in mg nach 16 Tagen	296	320	339	310	247	191	320	378	369	345	320	209	390	381	219
Relat. Abbaugeschw.	**76**	**82**	**87**	**79**	**63**	**49**	**82**	**97**	**95**	**88**	**82**	**54**	**100**	**98**	**56**
Glucoseschwund in mg nach 6 Tagen	259	277	261	232	201	170	261	291	269	210	122	171	266	286	189
Relat. Abbaugeschw.	**89**	**95**	**90**	**80**	**69**	**58**	**90**	**100**	**93**	**72**	**42**	**59**	**91**	**98**	**65**
Glucoseschwund in mg nach 9 Tagen	425	434	462	419	351	318	407	449	478	379	345	301	490	472	312
Relat. Abbaugeschw.	**87**	**89**	**94**	**86**	**72**	**65**	**83**	**92**	**98**	**77**	**70**	**61**	**100**	**96**	**64**
	Cellulobacillus mucosus														
Celluloseschwund in mg nach 20 Tagen	241	234	290	281	220	102	221	258	295	300	224	176	315	351	—
Relat. Abbaugeschw.	**69**	**67**	**83**	**80**	**63**	**29**	**63**	**74**	**84**	**85**	**64**	**50**	**90**	**100**	

Einfluss auf die Bakterientätigkeit haben, als wenn man sie als einzeln verwendet, sodass das Hinzufügen beider Substanzen in die Nährlösung, wie ich gewöhnlich verfahren habe, seinen Platz behauptet.

Um sich Gewissheit zu verschaffen, ob die Beobachtung, dass Mikroorganismen zur Verwertung von Liebigs Fleischextrakt und Pepton als alleinige Stickstoffquelle nicht fähig sind, nicht auf ir-

gendeinen Versuchsfehler zurückzuführen ist, habe ich diesen Umstand in einer neuen Versuchsserie durchgeprüft. Dabei wurden auch einige andere organische Stickstoffquellen wie Harnstoff, hydrolysiertes Kasein und Asparagin bezüglich ihrer Verwertbarkeit der Untersuchung unterworfen. Hydrolysiertes Kasein, das im allgemeinen eine ausgezeichnete Stickstoffquelle für Bakterien ist, wurde durch 16-stündiges Kochen mit 25 %iger Schwefelsäure hergestellt. Der Gehalt an Aminosäuren in der neutralisierten Lösung wurde durch eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ermittelt. Als Abbausubstrat diente nur Glucose. Vergleichsweise wurde auch Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle angewandt. Die Erlenmeyerkolben wurden mit *Cellulobacillus myxogenes* beimpft.

Tabelle VIII.

	Nährsalzlösung enthält als Stickstoffquelle									
Nährsalzlösung: K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4$ 1 „, NaCl 1 „	Harnstoff %		Asparagin %		Hydrolys. Kasein %		Liebigs Fleischextr. und Pepton %			$(NH_4)_2SO_4$ %
	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.3	0.05	0.1	0.3	0.2
Glucose abgebaut	337	341	—	—	312	312	—	—	68	390
in mg nach 8 Tagen	320	329	—	—	293	312	—	—	92	374
Mittel	329	335			303	312			80	382
Relat. Abbaugeschw.	**86**	**88**			**79**	**82**			**21**	**100**

Es wurde festgestellt, dass auch in solcher Nährlösung, die nur Pepton und Fleischextrakt als Stickstoffquelle enthält, ein, wenn auch sehr schwacher, Kohlenhydratabbau stattfinden kann. Doch geschah dies nur in den Kolben, die relativ reichlich Pepton und Fleischextrakt enthielten. In den Nährlösungen, in denen der Gehalt an diesen Stickstoffquellen drei- und sechsmal niedriger war, fand kein sichtbares Bakterienwachstum und kein Kohlenhydratabbau statt. Dies scheint mir darauf hin zu deuten, dass die Bakterientätigkeit in denjenigen Nährlösungen, die reichlich Pepton und Fleischextrakt enthalten, nicht auf die Verwertung der kompli-

zierten Eiweissverbindungen, sondern auf die Verwertung der in diesen Stickstoffquellen enthaltenen winzigen Mengen von Ammoniumstickstoff zurückzuführen ist. Die in hydrolysiertem Kasein enthaltenen Aminosäuren scheinen dagegen mit Sicherheit als Stickstoffquelle dieser Bakterien tauglich zu sein. Dasselbe gilt auch für den Harnstoff, der einen etwas günstigeren Einfluss als hydrolysiertes Kasein auf den Kohlenhydratabbau hat. Dem Ammoniumsulfat sind aber beide deutlich unterlegen. Asparagin war in beiden geprüften Konzentrationen als Stickstoffquelle untauglich.

Aus den oben angeführten Versuchsserien scheint klar hervorgegangen zu sein, dass diese zwei Bakterienarten bei der Stickstoffaufnahme auf ganz einfache Stickstoffverbindungen angewiesen sind, und zwar ist ihr enzymatischer Mechanismus — wenn man annimmt, dass die Nitrate zuerst zu Ammoniak reduziert werden — speziell der synthetischen Verwertung des Ammoniumstickstoffs angepasst.

4. Verhalten der Bakterien den Kohlenhydraten und den mit diesen verwandten Stoffen gegenüber.

Auf Grund der in der Literatur vorhandenen Angaben sind die cellulosezersetzenden Bakterien in Bezug auf ihr Vermögen, Kohlenhydrate anzugreifen, in zwei Gruppen einzuteilen: die einen sind nur auf die Cellulose angewiesen, die anderen können daneben zahlreiche andere Kohlenhydrate abbauen. Von den aeroben Bakterien gehören zur ersten Gruppe die *Spirochaeta cytophaga*-ähnlichen Mikroorganismen, denen nur Cellulose als Kohlenstoffquelle dienen kann, und auf deren Wachstum auf Cellulose die Zuckerarten hemmend wirken (vgl. Hutchinson und Clayton, Winogradsky, Dubos und Bokor). Zu der anderen Gruppe gehören u. a. die fakultativ aeroben Bakterien von Kellerman und seinen Mitarbeitern sowie diejenigen von Bradley und Rettger. Ausser Kohlenhydraten sollen diese Bakterien auch Polyalkohole wie Mannit und Glycerin zu zersetzen imstande sein.

Zur Prüfung meiner Bakterien auf ihr Vermögen, verschiedene Kohlenstoffquellen zu verwerten, wurden 0.5 %-ige Lösungen von verschiedenen Kohlenhydraten und verwandten Stoffen bereitet und 40 ccm dieser Lösungen in eine doppelte Reihe von Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt, sowie 10 ccm in eine Reihe von Proberörhchen hineinpipettiert. Die geprüften Kohlenstoffquellen waren folgende:

Pentosen: Arabinose, Xylose und Rhamnose.
Hexosen: Glucose, Mannose, Galaktose und Fructose.
Disaccharide: Saccharose, Lactose, Maltose und Cellobiose.
Trisaccharid: Raffinose.
Polysaccharide: Lösliche Stärke, Dextrin und Inulin.
Polyalkohole: Mannit, Sorbit, Dulcit, Erythrit und Glycerin.
Säuren: Calciumgluconat und Calciumlactat.

Als Nährlösung diente eine Lösung, die in 1 l Leitungswasser 3 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g Liebigs Fleischextrakt und 0.5 g Pepton enthielt. Nach Sterilisierung und Beimpfung wurde die eine Reihe der Kolben bei 37° 2 Tage, die andere 3 Tage lang bebrütet und dann die Reaktion in denjenigen Kolben, worin das Bakterienwachstum ersichtlich war, potentiometrisch gemessen. Als Versuchsobjekt diente *Cellulobacillus myxogenes.*

Tabelle IX.

Zuckerarten	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Glucose	Mannose	Galaktose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Cellobiose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Stärke	Mannit	Dulcit	Sorbit	Erythrit	Glycerin	Ca-gluconat	Ca-lactat
	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	—					+	
pH der Lösung nach 2 Tagen	6.10	5.92	—	6.03	6.27	5.99	6.62	6.20	5.90	5.85	5.80	6.23	—	5.59	5.51	—	—		—	—	—	—
pH der Lösung nach 3 Tagen	5.62	5.53		5.54	5.61	5.61	6.25	5.63	5.53	5.59	5.51	5.60	—	5.51	5.53							

Aus der Tabelle geht hervor, dass *Cellulobacillus myxogenes* fast alle geprüften Zuckerarten zu verwerten imstande ist. Von den 15 geprüften Zuckerarten waren nur Rhamnose und Inulin unangreifbar. Dagegen liess die Bakterie alle geprüften Polyalkohole: Mannit, Sorbit, Dulcit, Erythrit und Glycerin unzersetzt. Von den geprüften Oxysäuren war bei Gluconsäure ein deutliches Bakterienwachstum sichtbar. Bei Milchsäure blieb die Kulturflüssigkeit klar.

Bei Betrachtung der Veränderungen in der H'-Konzentration der Kulturflüssigkeiten ist bei allen zersetzbaren Kohlenhydraten nach 2 Tagen eine Herabsetzung des ursprünglichen pH-Wertes 7.1 zu beobachten. Augenfällig ist, dass die Senkung des pH-Wertes bei der Fructose bedeutend geringer ist als bei den übrigen geprüften Kohlenhydraten. Ein relativ niedriger pH-Wert ist auch bei Raffinose und Saccharose, die ja eine Fructosekomponente in ihrem Molekül enthalten, und bei Mannose erzielt worden. Am stärksten ist der pH-Wert bei Stärke und Dextrin herabgesetzt. Nach 3 Tagen war die Reaktion der Kulturflüssigkeiten bei allen Kohlenhydraten ausser bei der Fructose bis auf etwa pH 5.5—5.6 gesunken. Bei der Fructose wurde nur eine Endreaktion von pH 6.25 erzielt.

Gleichzeitig wurde mit *Cellulobacillus mucosus* in einer Proberöhrchenserie qualitativ festgestellt, dass sich dieser Bazillus den verschiedenen Kohlenhydraten gegenüber genau wie *Cellulobacillus myxogenes* verhält.

Um weitere Aufschlüsse über die Säurebildung bei verschiedenen Kohlenhydraten zu erhalten, habe ich die Säurebildung auch titrimetrisch verfolgt. Dazu wurden in zwei Reihen von Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt 100 ccm der 0.5 %-igen Lösungen der verschiedenen angreifbaren Kohlenhydraten eingefüllt. Den Lösungen der einen Reihe wurde 1 ccm einer wässrigen 0.04 %-igen Lösung von Phenolrot, den Lösungen der anderen Reihe 1 ccm einer wässrigen 0.04 %-igen Lösung von Bromkresolpurpur als Indikator zugegeben. Die Kolben wurden mit Wattepropfen verschlossen, durch die zum Eintröpfeln von

Lauge ein Kapillarrohr geführt war. Das Kapillarrohr war mit Watte verschlossen und ausserdem mittels eines an einem Ende verschlossenen Gummischlauchstückes gedichtet. In den beimpften Kulturflüssigkeiten wurde während der Bebrütung bei 37° die anfänglich rote Nuance des Phenolrots und die violette Nuance des Bromkresolpurpurs in gelb verwandelt. Durch vorsichtiges Zutröpfeln von sterilem n/2 NaOH aus einer Mikrobürette wurde die ursprüngliche Farbe der Lösung wiederhergestellt und in dieser Weise die Reaktion der mit Phenolrot versetzten Lösungen etwa bei pH 7.2 und die Reaktion der mit Bromkresolpurpur versetzten etwa bei pH 6.2 gehalten. Das Zutröpfeln des Natriumhydroxyds wurde möglichst steril ausgeführt. Wegen der grossen Infektionsgefahr durch Begleitbakterien wurden die Kolben nur 6 Tage lang bebrütet. Die Nährlösung hatte dieselbe Zusammensetzung wie im vorigen Versuche. Bei einigen getrennten Versuchen, in welchen die Glucose als Abbausubstrat diente, wurde der Nährlösung statt des Ammoniumsulfats Natriumnitrat zugesetzt. Folgende Tabelle zeigt die bei jeder Zuckerart verbrauchte Menge Alkali in ccm n/10 NaOH ausgedrückt.

Tabelle X.

Zuckerarten	Arabinose	Xylose	Glucose	Mannose	Galaktose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Cellobiose	Raffinose	Dextrin	Stärke
Verbrauchtes Alkali	*Phenolrot-Serie*												
in ccm n/10 NaOH . .	10.5	11.5	11.3	9.4	11.2	4.1	11.2	12.2	11.7	11.5	10.3	11.4	11.9
Verbrauchtes Alkali	*Bromkresolpurpur-Serie*												
in ccm n/10 NaOH . .	3.2	4.4	5.0	4.6	4.1	0	3.2	4.7	5.5	5.0	3.3	6.2	6.5

Aus der Tabelle ersieht man, dass in Übereinstimmung mit dem vorigen Versuche die Säurebildung aus der Fructose sehr gering ist. In derjenigen Reihe der Kolben, worin die Kulturflüssigkeiten gegen Bromkresolpurpur eingestellt wurden, wurde bei der Fruc-

tose kein Natriumhydroxyd verbraucht, weil die Reaktion der Lösung nicht binnen 5 Tagen unter den pH-Wert 6.2 sank, bei dem der Umschlagspunkt der Farbe des Bromkresolpurpurs liegt. Die Säurebildung ist in der Phenolrot-Serie bei allen anderen geprüften Kohlenhydraten relativ gleichmässig. Die Schwankungen dürften innerhalb der Fehlergrenzen liegen. In der Bromkresolpurpur-Serie beobachtet man grössere Schwankungen. Die grösste Säuremenge ist von Dextrin und Stärke, die geringste von Saccharose, Raffinose und Arabinose gebildet worden. Die Resultate stützten also zum Teil die Befunde des vorigen Versuches.

Im übrigen gibt die grosse Überlegenheit der Säurebildung in der Phenolrot-Serie einen sehr anschaulichen Beweis dafür, dass das pH-Optimum dieser Bakterienart, wie früher angeführt, bei neutraler Reaktion liegt.

In denjenigen getrennten Versuchen, in denen statt des Ammoniumsulfats Natriumnitrat als Stickstoffquelle verwendet wurde, war eine sehr geringe Säurebildung zu beobachten. Die gebildeten organischen Säuren und der durch die Verarbeitung des Nitratstickstoffs freigewordene basische Teil des Salzes scheinen einander so gut zu kompensieren, dass die Reaktion der Lösung dem Neutralpunkt relativ nahe zu liegen kommt. Es ist möglich, dass die früher erwähnte Überlegenheit des Natriumnitrats und Kaliumnitrats als Stickstoffquelle dadurch zu erklären ist, dass die Reaktion der Natriumnitrat oder Kaliumnitrat enthaltenden Nährlösungen sich beim Abbauprozesse dem Neutralpunkte näher hält als die Reaktion der mit Ammoniumsulfat oder Ammoniumchlorid versetzten Nährlösungen, die trotz der neutralisierenden Wirkung des zugesetzten Calciumcarbonats etwas unter den pH-Wert 6.0 sinkt.

Es wurde zuletzt eine Versuchsserie angestellt, worin die Abbaugeschwindigkeiten der verschiedenen Kohlenhydrate durch quantitative Analysen verglichen wurden. Die Versuche wurden in gewöhnlicher Weise in Erlenmeyerkolben von 300 ccm ausgeführt, die mit 100 ccm von 0.5 %-igen Lösungen der Kohlenhydrate und 0.5 g. Calciumcarbonat beschickt waren. Zur Bestimmung der Zucker-

mengen wurde die Betrand'sche Methode verwendet, wobei Stärke, Dextrin und Saccharose zuerst mit Salzsäure hydrolysiert wurden.

Tabelle XI.

Zuckerarten	Arabinose	Xylose	Glucose	Mannose	Galaktose	Fructose	Saccharose	Lactose	Maltose	Dextrin	Stärke
Kohlenhydrat. abgebaut,	237	210	220	202	240	162	201	214	198	316	309
in mg nach 7 Tagen	228	235	215	218	222	170	201	201	182	305	309
Mittel	233	223	218	210	231	166	201	208	190	311	309

Von den geprüften Kohlenhydraten sind somit Stärke und Dextrin am schnellsten abgebaut worden. Am schlechtesten verwertbar ist die Fructose und danach die Maltose gewesen. Bei den anderen Kohlenhydraten sind grössere Schwankungen in der Abbaugeschwindigkeit nicht zu beobachten.

Die auffällig gute Fähigkeit dieser Bakterie, auch Pentosen zu zersetzen, weist dahin, dass der Mikroorganismus in der Natur ausser bei dem Celluloseabbau auch bei der Wegschaffung der Pentosane der toten Pflanzenteile eine bedeutende Rolle spielt.

Bei der Zersetzung der Kohlenhydrate ist keine Gasbildung sichtbar. Das bedeutet aber keinesfalls, dass der Zersetzungsprozess ohne Gasbildung verläuft. Wie ich im folgenden Teil meiner Untersuchungen nachweisen werde, wird bei den beiden beschriebenen Bakterienarten ein sehr beträchtlicher Teil des verbrauchten Kohlenhydrates zu Kohlendioxyd verbrannt.

5. Katalasegehalt der Bakterien.

Die Untersuchung der in Mikroorganismen vorhandenen Katalase hat recht grosse theoretische Bedeutung. Nach der Dehydrierungstheorie von Wieland wird Wasserstoffsuperoxyd nur unter Einwirkung von molekularem Sauerstoff gebildet. Es wäre

somit zu erwarten, dass die anaeroben Mikroorganismen, die keinen Nutzen von einem Wasserstoffsuperoxyd spaltenden Enzym haben, sehr arm an Katalase, die aeroben dagegen, für welche die Katalase von Bedeutung ist, sehr stark katalasehaltig wären. In Übereinstimmung mit der Theorie von Wieland haben sich manche anaerobe Bakterien als sehr katalasearm erwiesen. Dann haben D. und M. Rywosch (1907) und Stapp (1924) beobachtet, dass der Katalasegehalt der fakultativ anaeroben Bakterien stark sinkt, wenn man die Bakterien unter anaeroben Bedingungen züchtet. Andererseits soll nach Kirchner (1927) bei Züchtung der fakultativ anaeroben Bakterien bei Anwesenheit von Sauerstoff der Katalasegehalt der Bakterien in beträchtlichem Masse wachsen.

Im Widerspruch zu diesen Beobachtungen stehen die Befunde von Virtanen und seinen Mitarbeitern. So haben Virtanen und Karström (1925) unter Anwendung einer von ihnen ausgearbeiteten, zuverlässigen Methodik festgestellt, dass bei *B. prodigiosum* und *B. lactis amari* der Katalasegehalt unter anaeroben Bedingungen erhöht wird. Virtanen und Winter (1928) stellten fest, dass Kolibakterien, welche in einer sauerstoffhaltigen Nährlösung gezüchtet worden waren, vielleicht etwas mehr Katalase enthielten als die unter anaeroben Bedingungen gezüchteten. Der Unterschied war doch sehr klein. Ausserdem haben die Autoren gefunden, dass bei einer Propionsäurebakterie, die obligat anaerob war, der Katalasegehalt ausserordentlich gross war.

Weil meine Bakterien streng aerob sind und ihr Stoffwechsel einen ausgeprägt oxydativen Charakter hat, schienen sie mir sehr geeignete Versuchsobjekte zu sein, wenn man Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen dem Katalasegehalt und dem oxydativen Stoffwechsel zu erhalten wünscht.

Zur quantitativen Ermittelung des Katalasegehaltes wurden beide Bakterienarten in einem 2 l fassenden, mit 500 ccm einer 0.25 % Glucose enthaltenden Nährlösung und 0.1 g $CaCO_3$ beschickten Erlenmeyerkolben gezüchtet. Nach 4 Tagen wurden die Bakterien abzentrifugiert und die schleimige Bakterienmasse in 55 ccm 1/150

mol. Phosphatlösung aufgeschwemmt. Die Bestimmung des Katalasegehaltes erfolgte dann genau nach den Angaben von Virtanen und Karström.

Tabelle XII.

Cellulobacillus myxogenes.

Zeit in Minuten	1/40 nK MnO_4 ccm	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	Berechnung des Katalasevermögens (Kat. v.)
0	23.7	—	1 ccm der Bakteriensuspension enthielt
14.1	23.3	0.000 524	96×10^6 Zellen
25.1	23.0	0.000 519	Mithin:
31.5	22.8	0.000 534	Kat. v. $= \frac{0.000\,529}{96 \times 10^6} = \mathbf{0.00551 \times 10^{-9}}$
42.0	22.5	0.000 537	
	Mittel	$k = 0.000\,529$	

Tabelle XIII.

Cellulobacillus mucosus.

Zeit in Minuten	1/40 nK MnO_4 ccm	$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	Berechnung des Katalasevermögens
0	22.2	—	1 ccm der Bakteriensuspension enthielt
10.2	21.8	0.000 774	102×10^6 Zellen
20.4	21.4	0.000 781	Mithin:
27.8	21.1	0.000 794	Kat. v. $= \frac{0.000\,779}{102 \times 10^6} = \mathbf{0.00764 \times 10^{-9}}$
37.0	20.8	0.000 765	
	Mittel	$k = 0.000\,779$	

Zum Vergleich mit den in den Tabellen wiedergegebenen Zahlen führe ich hier einige in den Arbeiten von Virtanen und seinen Mitarbeitern publizierte Zahlen an, welche den Katalasegehalt einiger fakultativ aerober Bakterien sowie der genannten Propionsäurebakterie wiedergeben.

B. lactis amari ..... 0.19×10^{-9}
B. prodigiosum ..... 0.13×10^{-9}
B. pyocyaneum ..... 0.41×10^{-9}
B. acidi propionici .... 2.2×10^{-9}

Aus dem Vergleich der Zahlen geht hervor, dass die Zahlen nicht in Übereinstimmung mit der allgemeinen Auffassung stehen. Obgleich *Cellulobacillus myxogenes* und *Cellulobacillus mucosus* streng aerob sind, ist ihre Katalasewirksamkeit äusserst gering. Man könnte fast sagen, dass die Bakterien praktisch genommen keine Katalase enthalten. Bei der streng anaeroben Propionsäurebakterie ist der Katalasegehalt wiederum enorm gross. Auf Grund dieser Befunde ist es etwas schwer zu verstehen, dass wenigstens bei diesen von mir untersuchten Bakterien irgendein Zusammenhang zwischen dem Katalasegehalt und dem oxydativen Stoffwechsel bestehen sollte.

Zusammenfassung.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden zuerst Isolierungsversuche von verschiedenen cellulosezersetzenden Mikroorganismen gemacht und dabei die in der Literatur angeführten Reinzüchtungsmethoden einer Überprüfung unterzogen. In diesen Versuchen gelang die Isolierung von absoluten Reinkulturen mit voller Sicherheit nur dann, wenn es möglich war, die Mikroorganismen unter Anwendung von festen Nährböden von Kolonien aus reinzuzüchten. Als fester Nährboden wurde dabei mit Erfolg Celluloseagar benutzt, zu dessen Bereitung aus Schwefelsäure fein ausgefällte Cellulose verwendet worden war. Mit Hilfe desselben wurden neben Actinomyces- und Schimmelpilzarten einige kräftige aerobe Cellulosebakterien reingezüchtet. Die Isolierung der anaeroben Bakterien gelang in keiner Weise.

Von den thermophilen Cellulosebakterien wurde als Reinkultur ein obligat aerober, sporenbildender, gramnegativer Bazillus gezüchtet, dessen wichtigsten Eigenschaften kurz beschrieben wurden.

Von den mesophilen Bakterien wurden zwei aerobe, sporenbildende, gramnegative Bazillen isoliert, die von allen geprüften, mesophilen aeroben Mikroorganismen die Cellulose am kräftigsten angriffen und auch den in der Literatur beschriebenen aeroben Bakterien überlegen zu sein schienen.

Die Bakterien erwiesen sich als neue, in der Literatur nicht früher beschriebene Arten und wurden *Cellulobacillus myxogenes n. sp.* und *Cellulobacillus mucosus n. sp.* genannt. Die Unterscheidung dieser in mancher Hinsicht einander sehr ähnlichen Bakterien als zwei Arten geschah auf Grund ihrer morphologischen Merkmale, die oben ausführlich beschrieben worden sind.

Charakteristisch für *Cellulobacillus myxogenes* ist u. a., dass er auf Kartoffel nicht wächst, auf gewöhnlichem Nähragar äusserst schlecht gedeiht, darauf eigentümliche Polkörperchen enthaltende Formen aufweist und eine sehr grosse Neigung zur Sporenbildung hat.

Cellulobacillus mucosus wächst sehr gut auf Kartoffel, weist darauf sehr grosse, in Ketten liegende Formen auf, bildet auf gewöhnlichem Nähragar gut ausgebildete Kolonien und bildet nicht so reichlich Sporen wie der vorige Bazillus. Die Bakterien liegen oft in kurzen Ketten.

Ausserdem sind in Bezug auf die Form der Kolonien zwischen beiden Bakterien grosse Unterschiede zu beobachten.

Die Bakterien wachsen äusserst schwach in gewöhnlicher Nährgelatine, die nicht verflüssigt wird. In der Milch findet kein Wachstum statt.

Die Sporenbildung erfolgt nach dem Clostridium-Typus. Die Sporen ertragen Erhitzung auf 100° 4—5 Min. und sind speziell bei dem *Cellulobacillus myxogenes* sehr resistent gegen Austrockung.

Man kann die Bakterien in vielen Generationen in cellulosefreien Medien züchten, ohne dass sie ihr Vermögen, Cellulose anzugreifen, verlieren. Die in der Literatur beschriebene Erscheinung, dass gewisse cellulosezersetzende Bakterien sofort, wenn sie auf cellulosefreiem Medium wachsen, ihre Zersetzungsfähigkeit verlieren, dürfte auf die Anwesenheit von Begleitbakterien zurückzuführen sein.

Die Bakterien sind drei Jahre lang auf künstlichen Medien im Laboratorium aufbewahrt, ohne dass ihre morphologischen wie kulturellen Eigenschaften wesentliche Veränderungen erfahren haben.

Der günstigste Intervall für die Tätigkeit der Bakterien liegt zwischen 30°—42°. Ein schärfer begrenztes Optimum war nicht festzustellen. Die oberste Grenze für das Wachstum liegt bei 44°.

Die pH-Grenzen des Wachstums liegen für den *Cellulobacillus myxogenes*, wenn die Cellulose als Substrat dient, bei pH 5.9 und pH 8.4, für den *Cellulobacillus mucosus* bei pH 6.1 und pH 8.4. Wenn

die Glucose als Substrat dient, ist bei dem *Cellulobacillus myxogenes* Wachstum zwischen pH 5.7 und pH 8.5, bei dem *Cellulobacillus mucosus* zwischen pH 5.9 und pH 8.5 wahrzunehmen. Wie durch Bakterienzählungen ermittelt wurde, liegt das Wachstumsoptimum des *Cellulobacillus myxogenes* innerhalb des Bereiches pH 6.5—7.5, also bei etwa neutraler Reaktion.

In denjenigen Versuchen, in welchen der Einfluss verschiedener Mineralsalze auf die Bakterientätigkeit geprüft wurde, wurde festgestellt, dass das zugesetzte Phosphat bei beiden Bakterien keinen deutlichen fördernden Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit der Cellulose und Glucose hat. Es erwies sich, dass die winzigen Mengen Phosphor, die in dem der Nährlösung zugesetzten 0.1 % Liebigs Fleischextrakt oder Pepton enthalten sind, den Phosphorbedarf der Bakterien gut decken können. Höhere Phosphatkonzentrationen wirken hemmend auf die Bakterientätigkeit. In einer 2 %-iger Phosphatlösung fand kein Bakterienwachstum statt.

Das Hinzufügen von Magnesiumsalzen hat bei beiden Bakterien eine deutliche, wenngleich nicht grosse, den Kohlenhydratabbau fördernde Wirkung. Natriumchlorid dagegen war ohne Wirkung. Die optimale Konzentration der in der Nährlösung angewandten Mineralsalze liegt bei etwa 0.3—0.4 %.

Die Bakterien sind bei der Stickstoffaufnahme auf ganz einfache Stickstoffverbindungen und zwar auf anorganische Stickstoffsalze angewiesen. Hinsichtlich ihres Einflusses auf den Cellulose- oder Glucoseabbau ist die Reihenfolge der geprüften anorganischen Nährsalze mit dem stärksten beginnend: Natriumnitrat, Kaliumnitrat, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat.

In den nitrathaltigen Nährböden war niemals eine Bildung von Nitriten oder Ammoniak nachzuweisen.

Obgleich Liebigs Fleischextrakt und Pepton allein in einer kleinen Konzentration den Bakterien als Stickstoffquelle nicht dienen können, haben sie schon von 0.05 % aufwärts, der rein mineralischen, eine anorganische Stickstoffquelle enthaltenden Nährlösung zugesetzt, einen starken, den Kohlenhydratabbau fördernden

Einfluss. Für *Cellulobacillus myxogenes* ist die günstigste Konzentration dieser Stoffe 0.1 0.3 %, für *Cellulobacillus mucosus* 0.3 0.5 %.

Hinsichtlich des *Cellulobacillus myxogenes* wurde festgestellt, dass derselbe hydrolysiertes Kasein und noch etwas besser Harnstoff als Stickstoffquelle verwerten kann. Beide Stoffe sind aber den anorganischen Stickstoffquellen unterlegen. Asparagin ist als Stickstoffquelle untauglich.

Ausser der Cellulose sind diese Bakterien imstande, zahlreiche andere Kohlenhydrate abzubauen. Abgebaut wurden: Arabinose, Xylose, Glucose, Mannose, Galaktose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose, Cellobiose, Raffinose, Dextrin und Stärke. Rhamnose und Inulin erwiesen sich als unangreifbar und ebenso alle geprüften Polyalkohole: Mannit, Sorbit, Dulcit, Erythrit und Glycerin. Dagegen ist Calciumgluconat für die Bakterien verwertbar. Es wurde bei *Cellulobacillus myxogenes* festgestellt, dass von den geprüften, angreifbaren Kohlenhydraten Stärke und Dextrin am schnellsten abgebaut wurden. Am schlechtesten verwertbar war Fructose. Hierbei scheint der Abbau im Gegensatz zu den anderen Kohlenhydraten ohne deutliche Säurebildung zu verlaufen.

Obgleich die Bakterien streng aerob sind, ist ihr Katalasegehalt äusserst gering.

Literaturverzeichnis.

Aoi, K. und Orikura, J.: On the decomposition of agar, xylan, etc. and the sugars related to these hemicelluloses by Vibrio Andoi (n. sp.). Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **74**, 321—333. 1928.

Abderhalden, E.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. I, Teil 5. 1922.

Bary, A. de: Über einige Sklerotinien. Botanische Zeitung **44**, 377. 1886.

Barthel, Chr.: Om cellulosans sönderdelning i jorden. Svensk Kemisk Tidskrift **39**, 221—232. 1927.

Benecke, W.: Bau und Leben der Bakterien. Leipzig und Berlin. 1912.

Behrens, J.: Untersuchungen über den Wurzelschimmel der Reben. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **3**, 584—589. 1897.

—„— Beiträge zur Kenntnis der Obstfäulnis. Loc. cit. **4**, 514—522. 1898.

Bergey's: Manual of Determinative Bakteriology. Baltimore 1923.

Bojanowsky, R.: Zweckmässige Neuerungen für die Herstellung eines Kieselsäure-Nährbodens und einige Beiträge zur Physiologie aerober Zellulose-löser. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **64**, 222—233. 1925.

Bokor, R.: Mycococcus cytophagus n. sp. 1929. Archiv für Mikrobiologie **1**, 1—34. 1930.

Bradley, L. A. and Rettger, L. F.: Studies on aerobic bacteria commonly concerned in the decomposition of cellulose. Journ. of Bact. **13**, 321—345. 1927.

Carbone, D.: Su la decomposizione aerobica della cellulosa. [Boll. Soc. med. Pavia 1910. T. 1, 13. V.; 1911. 1. IV]. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **32**, 252. 1911.

Coolhaas, C.: Zur Kenntnis der Dissimilation fettsaurer Salze und Kohlenhydrate durch thermophile Bakterien III. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **76**, 38—44. 1928.

Czapek, F.: Biochemie der Pflanzen. Dritte Auflage. Jena 1922.

Dubos, R. J.: Influence of the environmental factors on the activities of aerobic bacteria concerned in the decomposition of cellulose in soils. Journ. of Bact. **13**, 52—53. 1927.

—„— Decomposition of cellulose by aerobic bacteria. Journ. of Bact. **15**, 223—234. 1928.

Ellenberger, W.: Zur Frage der Celluloseverdauung. Zeitschr. f. phys. Chem. **96**, 236—254. 1915.

Flügge, C.: Die Mikroorganismen. Dritte Auflage. 1896.

Fousek, A.: Über die Rolle der Streptotricheen im Boden. Mitteilung der Hochschule für Bodenkultur. Wien 1913. Bd. **1**, 217. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **37**, 104. 1913.

Fred, E. B. and Waksman, S. A.: Laboratory Manual of General Microbiology. Cambridge 1928.

Gayon, U.: Recherches sur la fermentation du fumier. Compt. rend. **98**, 528—531. 1884.

Gescher, N. von: Über zellulosezersetzende Bakterien. Faserforschung **2**, 28—40. 1922. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **59**, 283—284. 1922.

Gray, P. H. H. and Chalmers, C. H.: On the stimulating action of certain organic compounds on cellulose decomposition by means of a new aerobic microorganism that attacks both cellulose and agar. Ann. Appl. Biol., **11**, 324—338. 1924.

Groenewege, J.: Untersuchungen über die Zersetzung der Cellulose durch aerobe Bakterien. Extr. du Bull. du Jard. Botan. de Buitenzorg, Ser. IV., 2, 261—314. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **53**, 414—418. 1920.

Günther, C.: Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig 1906.

Haubner: Amts- und Anzeigeblatt für die landwirtschaftlichen Vereine des Königsreichs Sachsen. 1854. Ref. Omelianski, Lafar's Handbuch der technischen Mykologie III, 264.

Hess, K.: Die Chemie der Zellulose und ihrer Begleiter. Leipzig 1928.

Heukelekian, H. and Waksman, S. A.: Carbon and nitrogen transformations in the decomposition of cellulose by filamentous fungi. Journ. Biol. Chem. **66**, 323—342. 1925.

Hoppe, Anna: Bakteriologische Untersuchungen ueber die Celluloseverdauung. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. **83**, 374—386. 1919.

—„— Ueber einen bisher unbekannten, celluloselösenden, im Verdauungstraktus vorkommenden Aspergillus, „Aspergillus cellulosae", seine Züchtung und seine Eigenschaften. Centralbl. f. Bakt. Abt. I Orig, **83**, 531—537. 1919.

Hoppe-Seyler, F.: Ueber die Gährung der Zellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. Zeitschr. f. phys. Chem. **10**, 201—217, 401—440. 1886.

Hutchinson, H. B. and Clayton, J.: On the decomposition of cellulose by an aerobic organism, Spirochaeta cytophaga. Journ. of Agric. Sc. **9**, 143—173. 1919.

Itano, A.: Studien über Cellulose. Ber d. Ōhara. Inst. f. landwirtsch. Forsch. **3**, 215—219. 1926. Ref. Chem. Zbl. **1927**, I_1, 1819.

Itano, A. und Arakawa, S.: Untersuchungen über die Katalase I. Verhalten der Katalase bei thermophilen Cellulosevergärern. Bull. agricult. Chem. soc. Japan **4**, 24—25. 1928. Ref. Chem Zbl. **1929**, II_1, 895.

van Iterson, C. jun.: Die Zersetzung von Cellulose durch aerobe Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **11**, 689—698. 1904.

Janke, A.: Zur Bakterien-Systematik Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **80**, 481—492. 1931.

Jörgensen, A.: Micro-organisms and Fermentation. London 1911.

Karrer, P.: Polymere Kohlenhydrate. Leipzig 1925.

Kean: Nature of certain plant-diseases. Botan. Gazette **15**, 170. 1890. Ref. Oppenheimer, Die Fermente II, 752.

Kellerman, K. F. and McBeth, I. G.: The fermentation of cellulose. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **34**, 485—494. 1912.

Kellerman, K. F., McBeth, J. G., Scales, F. M. and Smith, N. R.: Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **39**, 502—522. 1913.

Khouvine, Y.: Un anaerobie de l'intestin humain digérant la cellulose. Soc. Biol. **87**, 922—923. 1922.

—„— Digestion de la cellulose par la flore intestinal de l'homme. Ann. Inst. Pasteur **37**, 711—752. 1923.

Kirchner, S.: Ref. Virtanen und Winter.

Kissling: Zur Biologie der Botrytis cinerea. Dissert. Dresden 1889.

Kosin: Über aerobe Zersetzung von Cellulose durch Schimmelpilze. Nachr. d. phys. chem. Lomonossow-Ges. Moskau **2**, Nr. 1, 57—98. 1921. Ref. Chem. Zbl. **1922**, III, 874.

Krainsky, A.: Die Aktinomyceten und ihre Bedentung in der Natur. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **41**, 649—688. 1914.

Kroulik, A.: Über thermophile Zellulosevergärer. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **36**, 339—346. 1912.

Kruse, W.: Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.

Lafar, F.: Handbuch der Technischen Mykologie III. Jena 1904—1906.

Langwell, H. and Hind, H. L.: Cellulose fermentation. The utilitzation of spent hops and grains. Journ. Inst. Brewing. **29**, 302—320. 1923; Wchschr. f. Brauerei **40**, 123—124. 1923.

Langwell, H. and Lymn, A.: Action of bacteria on cellulose materials. Journ. Soc. Chem. Industry **42**, 280—287. 1923.

Lawrence, J. S. and Ford, W. W.: Studies on aerobic spore-bearing nonpathogenic Bacteria. Journ. of Bact, **1**, 273—319. 1916.

Laubach, C. A., Rice, J. L. and Ford, W. W.: Studies on aerobic spore-bearing non-pathogenic Bacteria. Journ. of Bact. **1**, 493—533. 1916.

Lehman, K. B. und Neuman, R. O.: Bakteriologie. Siebente Auflage. München 1927.

Löhnis, F.: Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Berlin 1910.

—„— Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie. Berlin 1913.

Löhnis, F. und Lochhead, G.: Über Zellulose-Zersetzung. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **37**, 490—492. 1913.

—„— Experiments on the decomposition of cellulose by aerobie bacteria. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **58**, 430—434. 1923.

Matzuschita, T.: Bakteriologische Diagnostik. Jena 1902.

McBeth, I. G. and Scales, F. M.: Destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. U.S. Dept. Agr. Bur. Plant. Industry Bull. **266**, 1—52. 1913. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **39**, 167. 1913.

McBeth, I. G., Scales, F. M. and Smith, N. R.: Characters of cellulosedestroying bacteria. Science **38**, 415. 1913.

MacFayden, A. and Blaxall, F. B.: Thermophilie Bacteria. Trans. Jenner Inst. Prev. Med., Ser. II., 162—187. 1899. Ref. Kroulik.

Merker, E.: Parasitische Bakterien auf Blättern von Elodea. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **31**, 578—590. 1911.

Migula, W.: System der Bakterien II. Jena 1900.

Mitscherlich, E.: Über die Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königl. Preuss. Academie der Wissenschaften. S. 102. Berlin 1850. Ref. Omelianski, Lafar's Handbuch der technischen Mykologie III, 247.

Miyoshi, M.: Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. Jb. wiss. Bot. **28**, 227. 1885.

Mütterlein, C.: Studien über die Zersetzung der Zellulose im Dünger und Boden. Inaug.-Dissert. Leipzig 1913. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **39**, 167—169. 1913.

Newcombe, F. C.: Cellulose-Enzymes. Annals of Botany, **13**, 49. 1899.

Nyberg, C.: Zur Biologie des Bacillus Mycoides I. Die Kolonietypen, welche durch sogenannte Mutation, aus dem Bac. Mycoides entstehen können. Acta Societatis Medicorum Fennicae „Duodecim", Tom XII, Fasc. 2. 1929.

Omelianski, W.: Sur la fermentation de la cellulose. Compt. rend. **121**, 653—655. 1895.

—„— Sur la fermentation cellulosique. Compt. rend. **125**, 970—973. 1897.

—„— Ueber die Gärung der Zellulose. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **8**, 193—201, 225—231, 257—263, 289—294, 321—326, 353—361, 385—391. 1902.

Omelianski, W.: Ueber die Trennung der Wasserstoff- und Methangärung der Cellulose. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **11**, 369—377. 1904.

—„— Die histologischen und chemischen Veränderungen der Leinstengel unter Einwirkung der Mikroben der Pektin- und Zellulosegärung. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **12**, 33—43. 1904.

—„— Ueber Methanbildung in der Natur bei biologischen Prozessen. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **15**, 673,—687. 1906.

—„— Zur Frage der Zellulosegärung. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **36**, 472—473. 1912.

Oppenheimer, C.: Die Fermente und ihre Wirkungen I und II. Leipzig 1925—1926.

Orla-Jensen, S.: Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **22**, 305—346. 1909.

Otto, H.: Untersuchungen über die Auflösung von Zellulosen und Zellwänden durch Pilze. Inaug-Dissert. Berlin 1916.

Peterson, W. H., Fred, E. B. and Marten, E. A.: The effect of molecular complexity on the end products formed by Clostridium thermocellum. Journ. Biol. Chem. **70**, 309—317. 1926.

Popoff, L.: Ueber die Sumpfgasgärung. Pflüger's Arch. Physiol. **10**, 113—146. 1875.

Praźmowski, A.: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentierung einiger Bakterienarten. Ref. Omelianski, Lafar's Handbuch der technischen Mykologie III, 248.

Pribram, E.: A Contribution to the classification of microorganisms. Journ. of Bact. **18**, 361—394. 1929.

Pringsheim, H.: Über den fermentativen Abbau der Zellulose. Zeitschr. f. phys. Chem. **78**, 266—291. 1912.

—„— Über die Vergärung der Zellulose durch thermophile Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **38**, 513—516. 1913.

—„— Die Polysaccharide. Berlin 1919.

—„— Der biologische Abbau der Cellulose. Angew. Botan **2**, 217—221. 1920.

Rippel, A.: Der biologische Abbau der pflanzlichen Zellmembranen. Angew. Botanik. **1**, 78—97. 1919.

Rubentschik, L.: Über Sulfatreduktion durch Bakterien bei Cellulosegärungsprodukten als Energiequelle. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **73**, 483—496. 1928.

—„— Zur Frage der aeroben Zellulosezersetzung bei hohen Salzkonzentrationen. Centralbl. f. Bakt. **76**, Abt. II, 305. 1928.

Rywosch, D. und M.: Über die Katalyse des H_2O_2 durch Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig., **44**, 295—298. 1907.

Sack, J.: Celluloseangreifende Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **62**, 77—80. 1924.

Sanborn, J. R.: The china blue-aurin-cellulose medium for the physiological study of cellulose destroyers. Journ. of Bact. **14**, 395—397. 1927.

—„— Physiological studies of cellulosedestroyers. Journ. of Bact. **16**, 315—319. 1928.

Sanborn, J. R. and Hamilton, W. B.: The influence of Azotobacter croococcum upon the physiological activities of cellulosedestroyers. Journ. of Bact. **18**, 169—173. 1929.

Scales, F. M.: A new method of precipitating cellulose for cellulose agar. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **44**, 661—663. 1915.

—„— Some filamentous fungi tested for cellulose destroying power. Bot. Gaz. **60**, 149—153. 1915. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **50**, 193. 1915.

van Senus, A. H. C.: Bijdrage tot de kennis der cellulosegisting. Ref. Kochs Jahresbericht 1890, s. 136. Leiden 1890.

Simola, P. E.: Über die aerobe Gärung der Zellulose (Vorläufige Mitteilung). Acta Chemica Fennica Nr 3. 1930.

Skinner, C. E.: The decomposition of cellulose by type strains of certain bacteria. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **78**, 508—512 1929.

Snieszko, St.: Beiträge zur Kenntnis der Zellulose zersetzenden Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **78**, 375—380. 1929.

Stapp, C.: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Bakterienfermente. Über Katalase und Peroxydase bei Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. I Orig. **92**, 161—193. 1924.

Stephenson, M.: Bacterial Metabolism. London 1930.

Tappeiner, H.: Die Darmgase der Pflanzenfresser. Ber. d. Deutsch. Chem. Gesell. **14**, 2375—2381. 1881.

—„— Ueber Zelluloseverdauung. Ber. d. Deutsch. Chem. Gesell. **15**, 999—1002. 1882.

—„— Vergleichende Untersuchung der Darmgase. Zeitschr. f. physiol. Chemie **6**, 432. 1882.

—„— Die Gase des Verdauungschlauches der Pflanzenfresser. Zeitschr. f. Biol. **19**, 228—279. 1883.

—„— Untersuchungen ueber die Gärung der Zellulose insbesondere ueber deren Lösung im Darmkanal. Zeitschr. f. Biol. **20**, 52—134. 1884.

—„— Nachträge zu den Untersuchungen ueber die Gärung der Zellulose. Zeitschr. f. Biol. **24**, 105—109. 1888.

Tetrault, P. A.: The fermentation of cellulose at high temperatures. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, **81**, 28—45. 1930.

van Tieghem, P. E. L.: Sur le Bacillus amylobacter et son rôle dans la putréfaction des tissus vegetaux. Bull. Soc. Bot. France **24**, 128—135. 1877.

van Tieghem, P. E. L.: Sur la fermentation de la cellulose. Compt. rend. **88**, 205—210. 1879.

—„— Sur la ferment butyrique (Bacillus amylobacter) a l'époque de la houille. Compt. rend. **89**, 1102—1104. 1879.

—„— Remarques sur l'état ou se trouvent les graines silicifices dans le terrain houiller de Saint-Étienne. Bull. Soc. Bot. France **28**, 243- 245. 1881.

Trécul, A.: Matiere amylacel et cryptogames amyliféres dans les vaisseaux du latex de plusieurs Apocynees. Compt. rend. **61**, 156—160. 1865.

—„— Production de plantules amyliféres dans les cellules végétales pendant la putréfaction. Chlorophylle cristallisée. Compt. rend. **61**. 432—436. 1865.

—„— Réponse a trois notes de M. Nylander concernant la nature des Amylobacter. Compt. rend **65**, 513—521. 1867.

Viljoen, J. A. Fred, E. B. and Peterson, W. H.: Fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. Journ. of Agric. Sc. **16**, 1—17. 1926.

Virtanen, A. I. und Karström, H.: Quantitative Enzymbestimmungen an Mikroorganismen. I. Der Katalasegehalt der Bakterien. Biochem. Zeitschr. **161**, 9—46. 1925.

Virtanen, A. I. und Winter, A. O.: Quantitative Enzymbestimmungen an Mikroorganismen. II. Biochem. Zeitchr. **197**, 210—221. 1928.

Waksman, S. A. Mikrobiological analysis of soil as an index of soil fertility. VIII. Decomposition of cellulose. Soil Science **17**. 275—293. 1924.

—„— Die Cellulose und ihre Zersetzung durch Mikroorganismen in Boden Mitt. Int. bodenkundl. Ges. **2**, 309—321. 1926. Ref. Chem. Zbl. **1927**. II.1. 389.

—„— Cellulose als eine Quelle des „Humus" im Erdboden. Cellulosechemie **8**, 97—103. 1927.

—„— Der gegenwärtige Stand der Bodenmikrobiologie und ihre Anwendung auf Bodenfruchtbarkeit und Pflanzenwachstum. Berlin—Wien 1930.

Waksman, S. A. und Heukelekian, H.: Cellulosezersetzung durch verschiedene Gruppen der Bodenmikroorganismen. Actes IV. Confer. Internat. Pedologie, Rom 1924 III. 216—218. Ref. Chem. Zbl. **1926**. II_2, 2446.

Waksman, S. A. and Skinner, C. E.: Microorganisms concerned in the decomposition of Celluloses in the soil. Journ. of Bact. **12**, 57—84. 1926.

Waksman, S. A. and Carey, C.: The use of the silica gel plate for demonstrating the occurrence and abundance of cellulose-decomposing bacteria. Journ. of. Bact. **12**, 87—95. 1926.

Waksman, S. A. et Dubos, R. J.: Sur la nature des organismes qui décomposent la cellulose dans les terres arables. Compt. rend. **185**, 1226—1228. 1927.

Ward, M.: On a lily disease. Ann. of. Bot. **2**, 317. 1888.

Werner, E.: Der Erreger der Zelluloseverdauung bei der Rosenkäferlarve (Potosia cuprea Fbr.) Bacillus cellulosam fermentans n. sp. Centralbl. f. Bakt. Abt. II **67**, 297—330. 1926.

Winogradsky, S.: Étude sur la microbiologie du sol. IV. Ann. Inst. Pasteur. **34**, 353—438. 1925.

—„— Recherches sur le dégradation de la cellulose dans le sol. Compt. rend. **184**, 493—497. 1927.

—„— Sur l'oxydation de la cellulose dans le sol. Compt. rend. **186**, 326—329. 1928.

—„— Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. Ann. Inst. Pasteur **43**, 549—633. 1929.

Erklärung der Tafeln.

Tafel I.

Fig. 1. *Cellulobacillus myxogenes.* 3 Tage alte Kolonien auf Celluloseagar. Natürliche Grösse.

Fig. 2. *Cellulobacillus mucosus.* 3 Tage alte Kolonien auf Celluloseagar. Natürliche Grösse.

Tafel II.

Fig. 1. *Cellulobacillus myxogenes.* 3 Tage alte Kolonie auf Celluloseagar. 30-fache Vergrösserung.

Fig. 2. *Cellulobacillus mucosus.* 3 Tage alte Kolonie auf Celluloseagar. 30-fache Vergrösserung.

Tafel III.

Fig. 1. *Cellulobacillus myxogenes.* 5 Tage alte Kolonie auf Stärkeagar. 30-fache Vergrösserung.

Fig. 2. *Cellulobacillus mucosus.* 5 Tage alte Kolonie auf Stärkeagar. 30-fache Vergrösserung.

Tafel IV.

Fig. 1. *Cellulobacillus myxogenes.* 4 Tage alte Kolonie auf Glucose-Nährlösung-Agar. 30-fache Vergrösserung.

Fig. 2. *Cellulobacillus mucosus.* 4 Tage alte Kolonie auf Glucose-Nährlösung-Agar. 30-fache Vergrösserung.

Tafel V.

Fig. 1. *Cellulobacillus myxogenes.* 4 Tage alte Kolonie auf Glucose-Nähragar. 30-fache Vergrösserung.

Fig. 2. *Cellulobacillus mucosus.* 4 Tage alte Kolonie auf Glucose-Nähragar. 30-fache Vergrösserung.

Tafel VI.

Cellulobacillus myxogenes.

Fig. 1. Mit Bakterien besetzte Filtrierpaperierfaser.

Fig. 2. Ausstrichpräparat einer 6 Tage alten Stärkeagarkultur.

Fig. 3. Ausstrichpräparat einer 2 Tage alten Glucose-Nährlösungkultur.

Fig. 4. Ausstrichpräparat einer 2 Tage alten Glucose-Nährlösungkultur, in welcher die Sporenentwicklung erkennbar ist.

Fig. 5. Ausstrichpräparat einer 4 Tage alten Stichkultur auf gewöhnlichem Nähragar. Körperchen enthaltende Bakterienformen.

Fig. 6. Geisselfärbung. 2 Tage alte Glucose-Nährlösung-Agarkultur.

Vergrösserung der Figuren 650-fach.

Tafel VII.

Cellulobacillus mucosus.

Fig. 1. Mit Bakterien besetzte Cellulosefaser.

Fig. 2. Ausstrichpräparat einer 8 Tage alten Stärkeagarkultur.

Fig. 3. Ausstrichpräparat einer 2 Tage alten Glucose-Nährlösungkultur.

Fig. 4. Ausstrichpräparat einer 3 Tage alten Glucose-Nährlösungkultur. Kurze Ketten.

Fig. 5. Ausstrichpräparat einer 4 Tage alten Stichkultur auf gewöhnlichem Agar.

Fig. 6. Ausstrichpräparat einer 3 Tage alten Kartoffelkultur. Grosse Bakterienformen.

Vergrösserung der Figuren 650-fach.

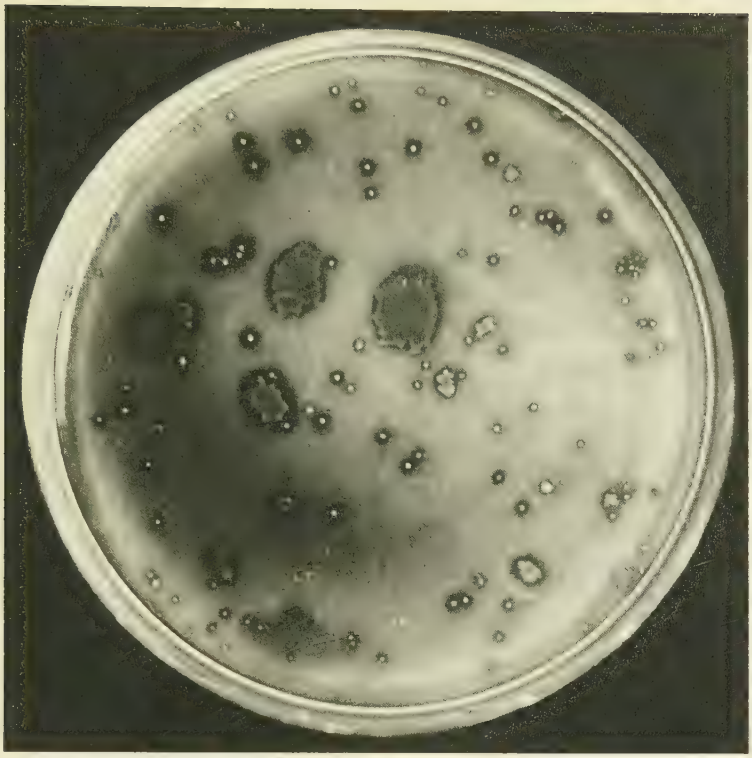

Fig. 1.

Fig. 2.

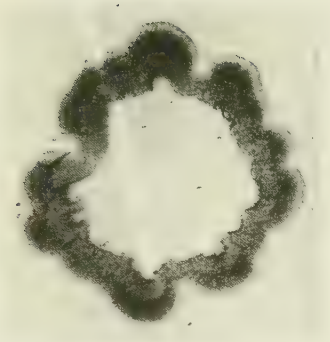

Fig. 1.

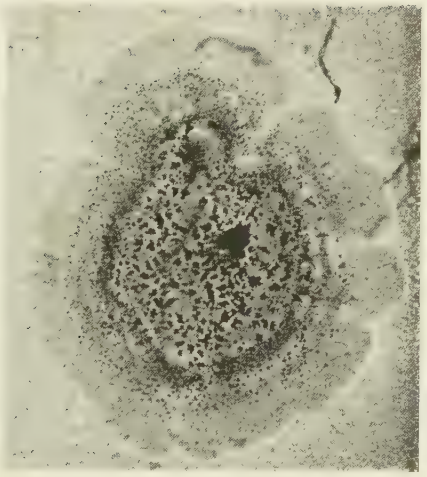

Fig. 2.

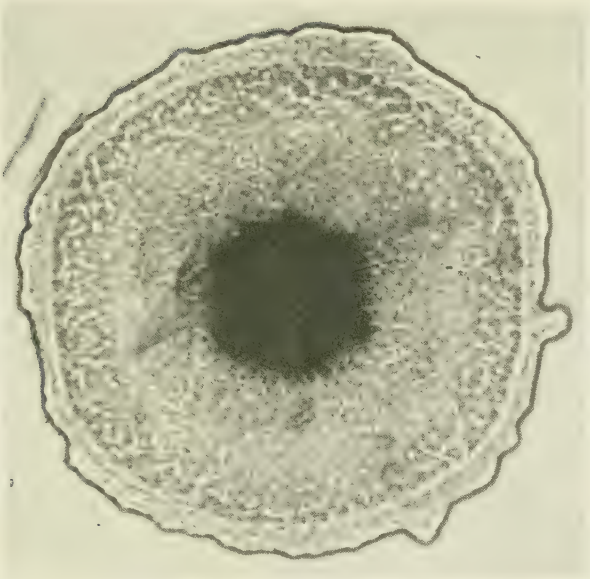

Fig. 1.

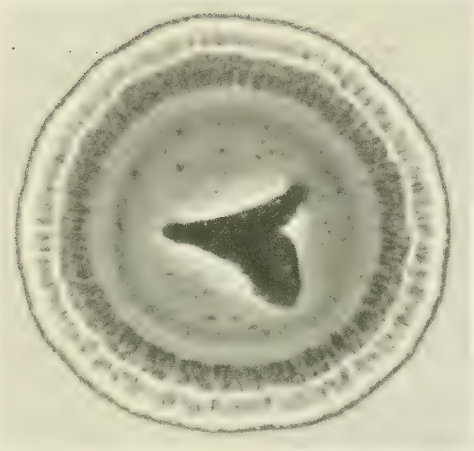

Fig. 2.

Tafel IV.

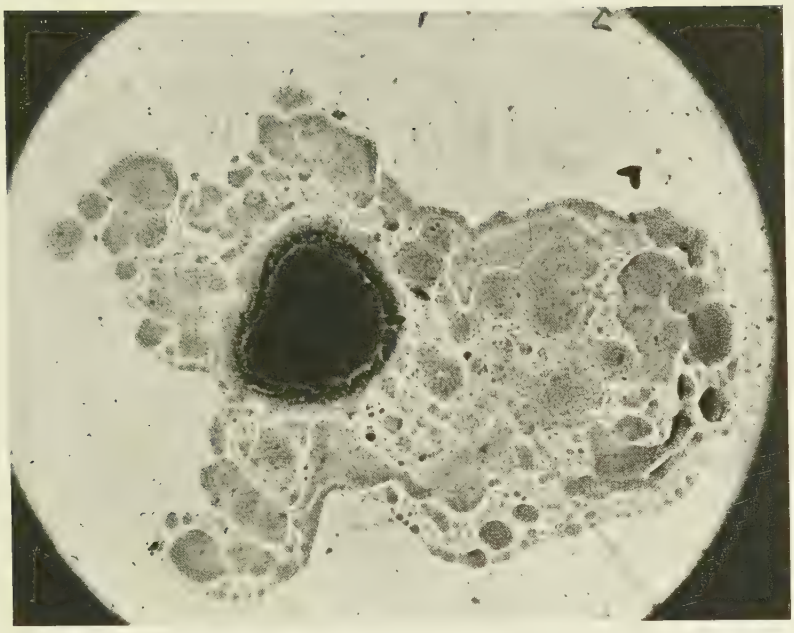

Fig. 1.

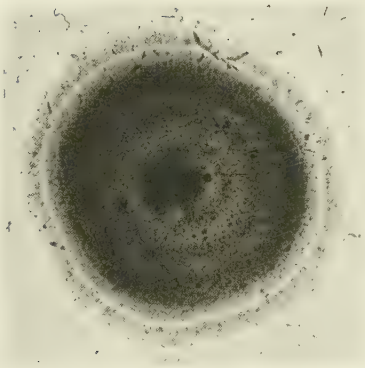

Fig. 2.

Tafel V.

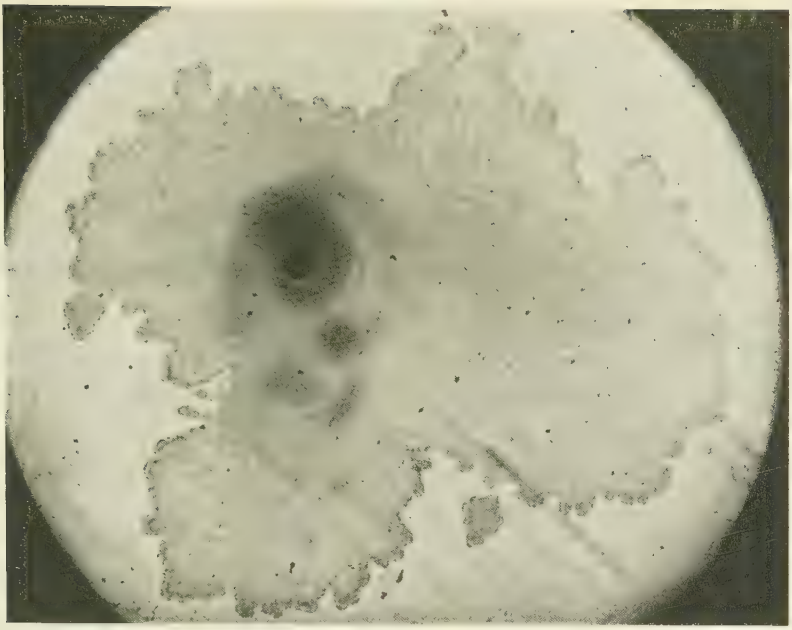

Fig. 1.

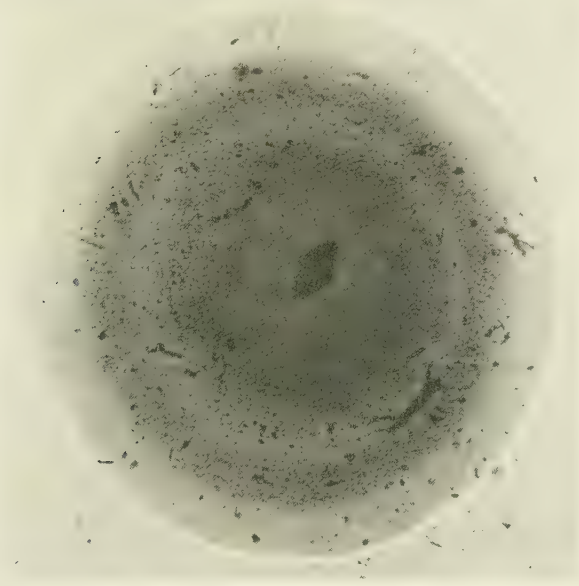

Fig. 2.

Tafel VI.

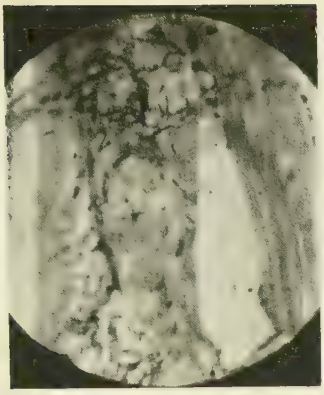

Fig. 1.

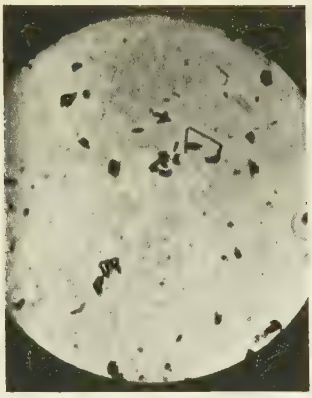

Fig. 2.

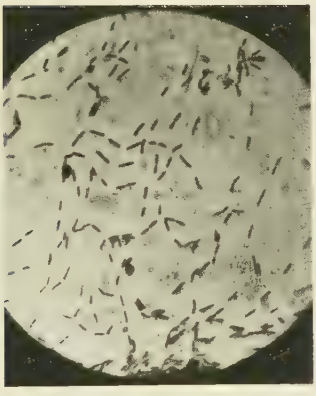

Fig. 3.

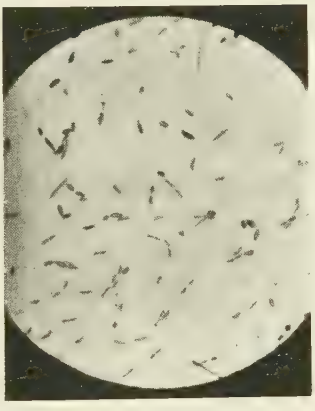

Fig. 4.

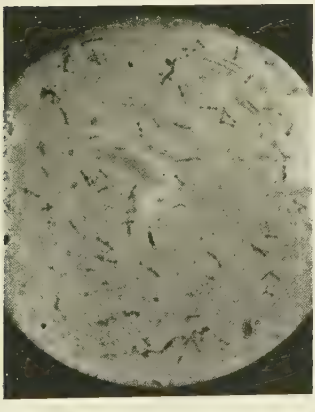

Fig. 5.

Fig. 6.

Tafel VII.

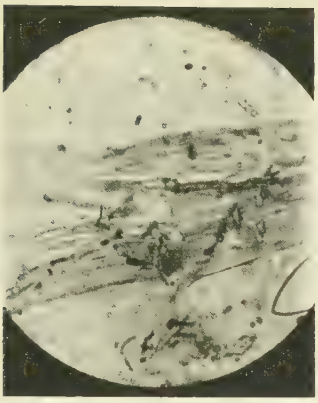

Fig. 1.

Fig. 2.

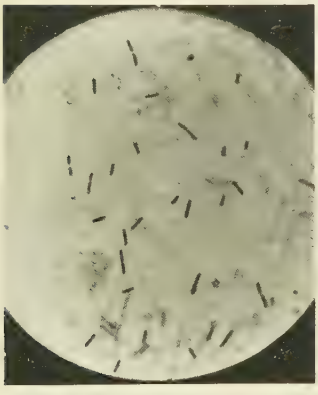

Fig. 3.

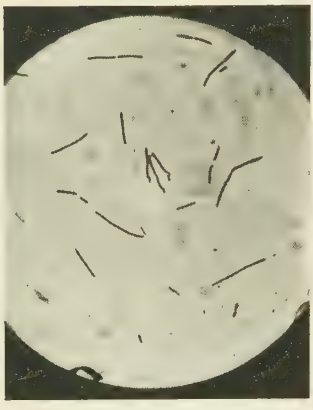

Fig. 4.

Fig. 5.

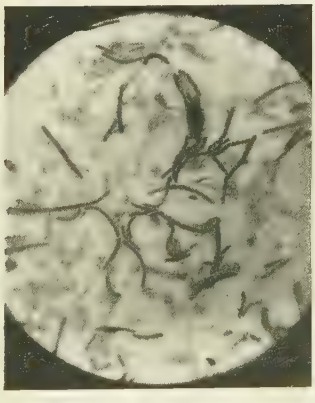

Fig. 6.